Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.D. Waller

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON MEDIKAMENTEN AUF DIE NAD–BIOSYNTHESE UND DIE ACETYLIERUNG VON ISONIKOTINSÄUREHYDRAZID

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Schomerus
aus Freiburg i. Br.

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0078

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.D. Waller

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON MEDIKAMENTEN AUF DIE NAD–BIOSYNTHESE UND DIE ACETYLIERUNG VON ISONIKOTINSÄUREHYDRAZID

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Schomerus
aus Freiburg i. Br.

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. E. Körber

1. Berichterstatter : Priv. -Doz. Dr. U. Dold
(Prof. Dr. H. D. Waller)

2. Berichterstatter : Professor Dr. M. Eggstein

FOTO - SCHNELLDRUCK Hans - Joachim Köhler - 74 TÜBINGEN - Neue Strasse 11

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock danke ich für die mir gebotene Möglichkeit, in den Laboren der Medizinischen Klinik Tübingen experimentell zu arbeiten.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. U. Dold danke ich für die Anregungen zu dieser Arbeit und die immer wieder gezeigte Bereitschaft, Methoden und Ergebnisse der Arbeit gemeinsam kritisch zu besprechen.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, mit deren Unterstützung die vorliegende Arbeit entstand.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
I. Teil	
Untersuchungen zur NAD-Biosynthese und zur Frage ihrer Beeinflussung durch Isonikotinsäurehydrazid und ß-Pyridylcarbinol	4
1. Einleitung und Fragestellung	4
1. 1. Reaktionswege des NAD-Stoffwechsels	4
1. 2. Regulation der intrazellulären NAD-Spiegel	8
1. 3. Die Vorläufer des NAD	11
1. 4. Medikamenteneinfluß auf den NAD-Stoffwechsel	15
1. 5. Fragestellung	17
2. Methoden	18
2. 1. Enzymatische NAD-Bestimmung	18
2. 2. Die Cyanid-Reaktion zur Bestimmung der oxydierten Pyridinnucleotide	19
2. 3. Die Keton-Fluoreszenz	20
2. 4. Die Bromcyan-Reaktion	20
2. 5. Papierchromatografie	21
2. 6. Hochspannungselektrophorese	21
2. 7. Synthese von Nikotinsäureadenindinucleotid (NSAD)	21
2. 7. 1. Präparation von NAD-Glykohydrolase aus Schweinehirn nach KAPLAN	21
2. 7. 2. Synthese des NSAD nach LAMBORG	22
2. 8. Trennung der NSAD-Syntheseprodukte nach Acetonfällung	23
2. 8. 1. Trennung durch Hochspannungselektrophorese	23
2. 8. 2. Trennung durch Papierchromatografie	23
2. 8. 3. Kombinierte Trennung	24
2. 8. 4. Kombinierte Trennung nach alkalischer Hydrolyse	25

Seite

2. 8. 5. Beurteilung dieser Ergebnisse 25
2. 9. Gewinnung von Ascites-Tumorzellen 26
2. 10. Inkubationsversuche mit Ascites-Tumorzellen 27
2. 10. 1. Inkubationsansätze 27
2. 10. 2. Aufarbeitung der Zellen 28
2. 10. 3. Bestimmung des NAD-Gehaltes der einzelnen Proben 28
2. 10. 4. Trennung des Perchlorsäureextraktes durch Hochspannungselektrophorese 28
2. 10. 5. Bestimmung der ^{14}C-Aktivität des aufgetrennten Perchlorsäureextraktes 29
2. 11. In vitro-Versuche mit Mäuseleber 29
2. 11. 1. Präparation von Leberschnitten 29
2. 11. 2. Ansätze und Aufarbeitung 30
2. 12. In vivo-Versuche zur NAD-Biosynthese in Rattenlebern 30
3. Untersuchungsergebnisse und deren Beurteilung 30
3. 1. Versuche mit Ascitestumorzellen 30
3. 1. 1. Einbau von NS in Pyridinnucleotide 30
3. 1. 2. Abfall der intrazellulären ^{14}C-Aktivitäten nach Austausch der ^{14}C-NS im Medium gegen nicht markierte Nikotinsäure 38
3. 1. 3. Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide 42
3. 2. Versuche mit Mäuseleberschnitten
Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in das NAD 47
4. Zusammenfassung 49

Seite

II. Teil

Untersuchungen über den Einfluß des Diphenylhydantoin auf die enzymatische Acetylierung des Isonikotinsäurehydrazid 50

1. Einleitung und Fragestellung 50

2. Methoden 52

2.1. Sprühreaktionen zur Identifikation von Ac-INH und INH auf Chromatogrammen 52

2.1.1. Ferroatsprühtest 52

2.1.2. Silbernitrat-Ammoniak-Sprühtest 52

2.2. Trennung von Ac-INH und INH durch Papierchromatografie 53

2.3. Trennung von Ac-INH und INH durch Hochspannungselektrophorese 53

2.4. Versuch des Nachweises von ^{14}C-Ac-INH nach Inkubation von Ascitestumorzellen und Mäuseleberschnitten mit ^{14}C-INH 54

2.5. Enzymatische Acetylierung des INH mit Taubenleberextrakt 55

2.5.1. Präparation eines Taubenleberextraktes, der Acetylase-Aktivität zeigt 55

2.5.2. Verfolgung der Acetylierungsreaktion am Photometer 55

2.5.3. Autoradiografischer Nachweis von ^{14}C-Ac-INH 56

2.5.4. Bestimmung eines Einflusses von DPH auf die INH-Acetylierung 57

3. Ergebnisse und deren Beurteilung 57

3.1. Photometrische Aufzeichnung der INH-Acetylierung. Einfluß von DPH. 57

3.2. Autoradiografischer Nachweis von ^{14}C-markieren Substanzen nach Inkubation von ^{14}C-INH mit Ac-CoA und Leberacetylase. Einfluß von DPH. 59

Seite

3. 3. Beurteilung der Ergebnisse 61

4. Zusammenfassung 61

Abkürzungen I

Strukturformeln einiger Verbindungen II

Herkunftsnachweis einiger Substanzen III

Literaturnachweis IV

Einleitung

Eine Arzneimittelwirkung ist mit dem Eingriff in bestimmte Stoffwechselvorgänge verknüpft. Dabei werden in der Regel auch biochemische Abläufe betroffen, deren Änderung nicht im Sinne der pharmakologischen Wirkung erwünscht ist. Hier beginnt der weite Bereich begleitender, unerwünschter oder schädigender Nebenwirkungen einer Arzneimitteltherapie. Eine möglichst umfassende Kenntnis des Wirkungsprofiles eines jeden Medikamentes ist daher für den therapeutischen Einsatz erwünscht. Die vorliegenden Untersuchungen sollten hierzu einen Beitrag leisten.

Eine zentrale Funktion in der Wasserstoffübertragung energieliefernder Reaktionen spielen die beiden Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotide NAD und NADP. Diese Koenzyme werden durch biosynthetische Reaktionen aus Bausteinen im Organismus selbst aufgebaut. Ausgehend von der Aminosäure Tryptophan oder auch von dem zur Vitamin-B-Gruppe gezählten Nikotinsäureamid oder der Nikotinsäure wird in mehreren Syntheseschritten NAD aufgebaut. Synthesewege wurden von PREISS und HANDLER (1958), HAYAISHI und Mitarbeitern (1963) und anderen Autoren beschrieben. Diese Biosynthesereaktionen sind abhängig von der Substratanlieferung der erforderlichen Bausteine und unterliegen dem Einfluß einer sehr reaktionsaktiven Abbaureaktion, der Spaltung durch die NAD-Glykohydrolase, die normalerweise an Zellorganellen gebunden in ihrer Aktivität weitgehend gehemmt ist.

Die NAD-Konzentration in der Zelle wird durch Arzneimittel beeinflußt, die in der Humantherapie Verwendung finden. Von ROITT (1956) wurde erstmals ein starker Abfall der NAD-Konzentration unter dem Einfluß alkylierender Cytostatica beobachtet. Unter der Einwirkung dieser Medikamente ist der NAD-Abfall in Tumorzellen in vitro (HOLZER et al. 1958) und Transplantationstumoren (GRUNDMANN et al. 1960) regelmäßig zu beobachten. Der NAD-Abfall ist offensicht-

lich Ursache der ebenfalls meßbaren Glykolysehemmung (MIELSCH et al. 1962). Lange Zeit sah man in der Glykolysehemmung den besten Weg zu einer Tumortherapie (DOMAGK) basierend auf der WARBURGschen Hypothese, das Wesen der malignen Entartung bestehe in dem Verlust der Zellatmung und dem Übergang des Stoffwechsels zur Glykolyse.

Eingehende Untersuchungen der einzelnen NAD-Biosyntheseschritte ließen dann allerdings keinen direkten Einfluß alkylierender Cytostatica auf diese Enzyme erkennen (GRUNICKE et al. 1966). Die Aktivierung der NAD-Glykohydrolase als Folge einer schon beginnenden Desintegrierung der Zelle erklärt den Abfall der NAD-Konzentration (HILZ et al. 1962 und 1963). Durch andere Untersuchungen konnte eine direkte Alkylierungsreaktion der Cytostatica an der DNS und RNS gefunden werden (LISS und PALME 1963). Bilanzuntersuchungen im arteriellen und venösen Schenkel von Transplantationstumoren zeigten auch, daß Glykolyse und NAD-Konzentration im Tumor durch alkylierende Cytostatica erst spät in fortgeschrittenen Schädigungsstadien betroffen werden (C. G. SCHMIDT 1970).

Auch für Medikamente mit anderer pharmakologischer Wirkung ist ein Einfluß auf die NAD-Biosynthese beschrieben worden. Dabei spielen eine besondere Rolle die zahlreichen Pharmaka, die Pyridinverbindungen sind und damit passende oder unpassende Bausteine zur NAD-Biosynthese liefern können. Dazu gehört das wichtige Tuberkulostaticum Isonikotinsäurehydrazid und die gefäßaktive Substanz ß-Pyridylcarbinol. Beide Substanzen wurden in dieser Untersuchung auf ihren Einfluß auf die NAD-Biosynthese geprüft.

In einem zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit wurde die Beeinflußbarkeit der metabolischen Arzneimittelumsetzung im Organismus untersucht. An der Wiederausscheidung eines Medikamentes sind oft enzymabhängige Umbaureaktionen beteiligt. Vererbbare Enzym-

mangelzustände können unter der Zufuhr bestimmter Arzneimittel zu Erkrankungen führen (z. B. Hämolysen) oder durch Abweichungen in der Ausscheidungsrate die Gefahr der Überdosierungen mit sich bringen. Ein Beispiel dafür ist die INH-Acetylierung.

Eine vorübergehende Hemmung einer solchen enzymatischen Ausscheidungsleistung wird andererseits therapeutisch genutzt, etwa in der tuberkulostatischen Kombinationsbehandlung mit INH und Paraaminosalicylsäure oder in einer Kombination von INH mit Phenylbutazon oder z. B. in der Einsparung von Penicillin und anderen durch die Nierentubuli ausgeschiedenen Medikamenten durch die gleichzeitige Gabe von Probenecid.

Unter der Medikation des Antiepileptikums Diphenylhydantoin werden ebenfalls höhere INH-Blutspiegel erreicht (DOLD 1970). In der vorliegenden Arbeit wurden an einem zellfreien System Versuche angestellt, um die Art dieses Hemmungsmechanismus zu bestimmen.

I. Teil

Untersuchungen zur NAD-Biosynthese und zur Frage ihrer Beeinflussung durch Isonikotinsäurehydrazid und ß-Pyridylcarbinol

1. Einleitung und Fragestellung

Trotz umfangreicher Untersuchungen verschiedener Forschergruppen ist es bis heute nicht gelungen, ein widerspruchfreies Bild von der Biosynthese des NAD zu bekommen. Es soll hier versucht werden, die wichtigsten Ergebnisse mit den daraus gezogenen Folgerungen darzustellen.

1.1. Reaktionswege des NAD-Stoffwechsels

Die von ROWEN und KORNBERG 1951 aufgestellte Hypothese, nach der die Synthese mit folgenden Reaktionen eingeleitet würde :

NSA + Ribose-1-phosphat + H^+ ⟶ NSA-ribosid + P

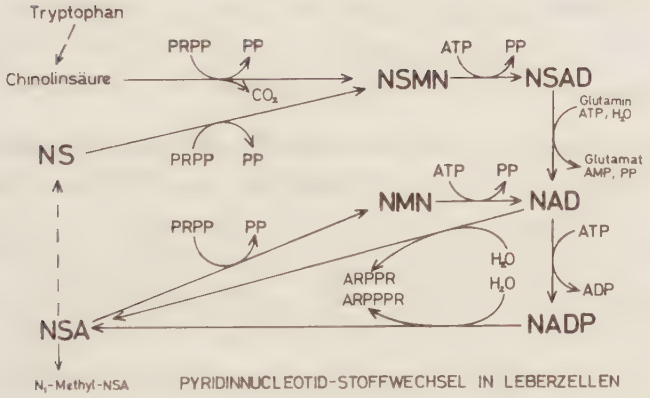
NSA-ribosid + ATP ⟶ NMN + ADP

mußte bald verlassen werden, da das Gleichgewicht der ersten Reaktion bei physiologischem pH für eine Synthese sehr ungünstig liegt (ZATMAN et al. 1953).

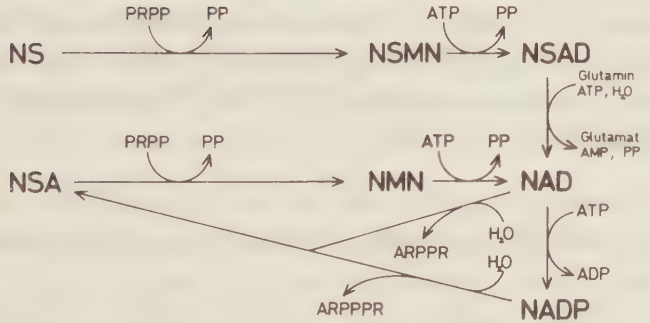
Zur Verdeutlichung der weiteren Ausführungen sollen zwei Schemata dienen, die 1968 von DIETRICH et al. veröffentlicht wurden. Es sind hier die heute bekannten Reaktionswege des NAD-Stoffwechsels in der Leberzelle und in der Ascitestumorzelle wiedergegeben (S. 5).

Für die Aufklärung dieser Auf- und Abbauwege waren die Untersuchungen der Arbeitsgruppen HANDLER und HAYAISHI richtungsweisend.

1958 beschrieben PREISS und HANDLER einen von Nikotinsäure ausgehenden Syntheseweg, der über zwei Vorstufen des NAD führt, die als NSMN und NSAD identifiziert werden konnten.



PYRIDINNUCLEOTID-STOFFWECHSEL IN LEBERZELLEN



PYRIDINNUCLEOTID-STOFFWECHSEL IN ASCITESZELLEN

nach DIETRICH (1968)

$$NS + PRPP \longrightarrow NSMN + PP$$

$$NSMN + ATP \longrightarrow NSAD + PP$$

$$NSAD + Glutamin + ATP + H_2O \longrightarrow NAD + Glutamat + AMP + PP$$

Der erste Schritt wird von der NSMN-Pyrophosphorylase katalysiert, die eine hohe Affinität zur NS hat (K_m = ca. 10^{-6} M). Auf diesem Weg kann also bei physiologischen NS-Konzentrationen (ca. 10^{-5} M) NAD gebildet werden. Während die den nächsten Schritt beschleunigende NAD-Pyrophosphorylase in der Kernfraktion von Leberhomogenat lokalisiert ist, findet man die NAD-Synthetase, die NSAD zu NAD amidiert, nur im Überstand. Sie benötigt neben ATP einen Aminogruppendonator.

HAYAISHI und Mitarbeiter konnten dann 1963 zeigen, daß es in Leberzellen einen Syntheseweg von Tryptophan zum NAD gibt, wobei NS als freie Zwischenstufe nicht gefunden wird. Die aus der 3-Hydroxy-Anthranilsäure entstehende Chinolinsäure bildet mit Phosphoribosylpyrophosphat unter Abspaltung von Kohlendioxyd NSMN. Die weiteren Schritte entsprechen dem PREISS-HANDLER-Syntheseweg (NISHIZUKA et al. 1963, IKEDA et al. 1965).

Die Bedeutung der direkten Synthese von NAD aus NSA mit Hilfe der schon 1957 von PREISS und HANDLER beschriebenen NMN-Pyrophosphorylase :

$$NSA + PRPP \longrightarrow NMN + PP$$

wird nicht einheitlich beurteilt. Die erwähnten Autoren bestimmten nämlich eine hohe Michaeliskonstante für das aus Erythrocytenacetonpuder gewonnene Enzym. Auch DOLD et al. (1963) benötigten hohe NSA-Konzentrationen (0,1 M), um mit Asciteszellacetonpuder NAD aus NSA zu synthetisieren.

Neuere Untersuchungen von DIETRICH et al. (1966) weisen aber daraufhin, daß die K_m bisher zu hoch bestimmt wurde, da es durch die Homogenisation zu einer Hemmung des Enzyms kommt. Nach Zusatz von Protaminsulfat fanden sie einen K_m-Wert von 2, 62 x 10^{-6} M NSA für das Enzym aus Rattenleber.

Sie unterscheiden nach den NMN- und NSMN-Pyrophosphorylaseaktivitäten drei Gruppen von Geweben (DIETRICH et al. 1968) :

1. Gewebe mit hoher NMN- und niedriger NSMN-Pyrophosphorylaseaktivität, z. B. Ascitestumorzellen
2. Gewebe mit gleicher Aktivität der beiden Enzyme, z. B. Leberzellen
3. Gewebe mit hoher NSMN- und niedriger NMN-Pyrophosphorylaseaktivität, z. B. Papillome.

Ein Enzym, das die Deamidierung von NSA zu NS katalysiert, wurde 1965 von PETRACK et al. und von CHAYKIN et al. beschrieben. Man fand für das aus Leberhomogenat gereinigte Enzym eine K_m von 4 x 10^{-2} M. Unter physiologischen Bedingungen (NSA ca. 10^{-4} M) dürfte dieses Enzym von geringer Bedeutung sein. Lediglich nach Verabreichung von hohen NSA-Dosen könnte die für das Enzym nötige Substratkonzentration erreicht werden (DIETRICH et al., Naturwissenschaften 1968).

Schließlich ist das als Ausscheidungsprodukt von NAD-Bausteinen in der Leber vieler Säuger gebildete N_1-Methylnikotinsäureamid zu erwähnen.

Welche Bedeutung kommt nun diesen Reaktionen im einzelnen für den NAD-Stoffwechsel zu ?

Sicher gibt es hier Spezies- und Organunterschiede. Einen Hinweis erhält man aus der Tatsache, daß viele Säugetiere und Vögel das Vitamin Nikotinsäure (oder Nikotinsäureamid) nicht brauchen, wenn sie ausreichend Tryptophan zur Verfügung haben (HENDERSON et al. 1949).

Verabreichung von Tryptophan an Ratten führt zu einem Anstieg der Ausscheidung von N_1-Methylnikotinsäureamid im Urin (ROSEN et al. 1946). Auch konnte durch Versuche mit ^{14}C-markiertem Tryptophan gezeigt werden, daß dieses im Körper zu N_1-Methylnikotinsäureamid umgewandelt wird (HEIDELBERGER et al. 1949). Die Arbeiten von HAYAISHI und Mitarbeitern brachten dann die einzelnen Reaktionsschritte dieser Umwandlung zu Tage.

Leber und Niere sind die einzigen Organe von Säugern, in denen die Bildung von NSMN aus Chinolinsäure beobachtet wurde (GHOLSON 1966). Andere Zellen (im Schema stehen stellvertretend dafür die Ascitestumorzellen) sind auf NSA und NS angewiesen, da ihre denovo-Synthese aus Tryptophan genetisch blockiert ist. DIETRICH vermutet, daß bei vielen Säugern dieses NSA für andere Organe von der Leber durch den ständig stattfindenden NAD-Abbau bereitgestellt wird. Dies scheint die einzige Quelle für endogenes NSA zu sein.

GHOLSON schlug 1964 vor, von einem "Pyridine Nucleotide Cycle" zu sprechen, da das durch die NAD-Glykohydrolase gebildete NSA (Einzelheiten darüber in Abschnitt 1. 2.) wieder zur Synthese von NAD verwendet werden kann. Der von PREISS und HANDLER gefundene Weg wäre demnach in der Säugerleber ein "Salvage Pathway" zur Wiederverwendung von NSA, das aus dem Abbau von NAD entstanden ist (GHOLSON 1964, 1966, 1968).

Zum Problem der Desamidierung des NSA meint KAPLAN (1968), daß diese auch auf einer Nucleosid- oder Nucleotidstufe stattfinden könnte. SARMA et al. (1961) fanden in Mäuseleber keine NSA-Deamidase, aber eine recht aktive NMN-Deamidase.

1. 2. Regulation der intrazellulären NAD-Spiegel

Jeder Zelltyp eines Organismus besitzt einen charakteristischen, ziemlich konstanten Gehalt an verschiedenen Enzymen und Koenzymen. Die Konzentration der beiden Koenzyme NADP und NAD ist in den ein-

zelnen Geweben sehr unterschiedlich. Sie korreliert eng mit der Menge an NADP- und NAD-spezifischen Enzymen des entsprechenden Gewebes. So findet man z. B. im Skelettmuskel mehr NAD als NADP, da hier die Bildung von energiereichen ATP-Molekülen durch Oxydation von reduziertem NAD im Vordergrund steht. Dagegen enthalten Leber und Nebennieren größere Mengen NADP, das hier in seiner reduzierten Form für die reduktiven Synthesereaktionen benötigt wird (KAPLAN 1968).

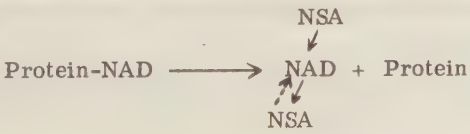
Der für einen gegebenen Zelltyp unter physiologischen Bedingungen gleichbleibende Spiegel der Pyridinnucleotid-Koenzyme legt die Frage nahe, wie der Spiegel in der Zelle konstant gehalten wird.

In seiner 1968 veröffentlichten Arbeit "Regulation of Pyridine Nucleotide Coenzymes" gibt KAPLAN drei Faktoren an, die für die Aufrechterhaltung der Koenzymspiegel in tierischem Gewebe verantwortlich sind :

1. die Menge der synthetisierenden Enzyme
2. die NAD-Glykohydrolase
3. die Menge der koenzymbindenden Enzyme.

Die Konstanz wird demnach einerseits durch das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau erreicht. Die Menge der koenzymbindenden Enzyme hat insofern Bedeutung, als gebundene Koenzyme von der NAD-Glykohydrolase nicht oder nur in geringerem Maß gespalten werden können. Da der größte Teil der Koenzyme in der Zelle an Enzyme gebunden ist, wird der NAD- und NADP-Spiegel im wesentlichen durch den Gehalt an koenzymbindenden Dehydrogenasen bestimmt.

Folgendes Schema nach KAPLAN macht die Regulationsmechanismen deutlich.



Das Enzym NAD-Glykohydrolase spaltet NAD und NADP an der NSA-ribosid-Bindung und ist durch NSA hemmbar, was MANN und QUASTEL bereits 1941 gefunden haben. 1952 konnten ZATMAN et al. für Rindermilz-NAD-Glykohydrolase zeigen, daß es sich hierbei um eine nichtkompetetive Hemmung infolge einer Austauschreaktion handelt, bei der das koenzymgebundene NSA durch ein freies NSA-Molekül ersetzt wird. Eine NSA-Konzentration von $1,5 \times 10^{-3}$ M bewirkt eine Hemmung des Enzyms auf die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität.

Die NAD-Glykohydrolase kann das NSA auch gegen andere Pyridinverbindungen austauschen, wobei sogenannte NAD-Analoge entstehen, die im folgenden Schema allgemein mit XRPPRA wiedergegeben sind. ZATMAN und KAPLAN nehmen eine Adenosindiphosphatribose-Enzym-Verbindung als Zwischenstufe an (1953 und 1968).

$$E + NRPPRA \underset{+N}{\overset{-N}{\rightleftharpoons}} E - RPPRA \underset{-X}{\overset{+X}{\rightleftharpoons}} XRPPRA$$

$$E - RPPRA \xrightarrow{+H_2O} E + RPPRA$$

Die Möglichkeit einer Synthese von NAD aus ARPPR und NSA mit Hilfe der NAD-Glykohydrolase ist ausgeschlossen, da die NSA-ribosid-Bindung sehr energiereich ist.

Bakterien besitzen nach KAPLAN (1968) einen anderen Regulationsmechanismus. In B. subtilis ist die NAD-Glykohydrolase an einen hitzelabilen Inhibitor (ein Protein) gebunden. Hohe NAD-Konzentrationen führen zu einer Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes und damit zu einer Aktivierung der NAD-Glykohydrolase.

Neben der von KAPLAN angegebenen Menge der synthetisierenden Enzyme scheinen auch Hemmungen dieser Enzyme durch Rückkoppe-

lungsmechanismen an der Regulation beteiligt zu sein. So konnte GHOLSON (1968) in Versuchen mit Tryptophan-Indol-^{14}C nachweisen, daß NAD ein wirksamer Hemmstoff für die Tryptophan-Pyrrolase ist (feedback-inhibition). Die Aktivität der Chinolinsäure-Decarboxylase in B. subtilis wird durch eine NS -Konzentration von 10^{-5} -10^{-4} M fast vollständig gehemmt (repression), während die NS auf die NSMN-Pyrophosphorylase-Aktivität keinen Einfluß hat (GHOLSON 1964).

1. 3. Die Vorläufer des NAD

Entsprechend den anfangs dargestellten Reaktionswegen ergeben sich drei mögliche Vorläufer des NAD :
Tryptophan, NSA und NS, deren einzelne physiologische Bedeutung für die NAD-Biosynthese schwer abzuschätzen ist.

Bei der in-vivo-Testung dieser Substanzen läßt sich die Effektivität eines Vorläufers grundsätzlich nach zwei Kriterien beurteilen :

1. nach dem Anstieg des NAD-Spiegels in der Zelle nach Verabreichung verschiedener Mengen eines Vorläufers
und 2. nach der Geschwindigkeit, mit der ein Vorläufer oder sein Umwandlungsprodukt in das NAD eingebaut wird.

Keines dieser beiden Kriterien gibt jedoch Aufschluß darüber, in welchem Ausmaß unter physiologischen Bedingungen die einzelnen experimentell gefundenen Reaktionswege in der Zelle beschritten werden. Es soll hier nur auf die Vorläufer NSA und NS eingegangen werden, die für die eigenen Versuche von Bedeutung sind.

Der NAD-Gehalt der Leber steigt nach Verabreichung von NSA in hohen Dosen stärker als nach äquimolaren Mengen NS. LANGAN und KAPLAN (1959) konnten nach intraperitonealer Applikation von NSA (500 mg/kg) an Mäuse einen Anstieg des Leber-NAD-Gehaltes messen, dessen Maximum bei einem bis zu 20-fachen des Ausgangswertes lag und nach 8 - 10 Stunden erreicht war.

Nach vier Stunden fanden sie 2060 µg NAD g Leber. In einem eigenen Versuch wurden einer Ratte 500 mg kg NSA i. p. injiziert. Der NAD-Spiegel der Leber vier Stunden danach war 1400 µg g Leberfeuchtgewicht.

Ein Anstieg des NAD-Gehaltes wird auch an isolierter, mit NSA perfundierter Rattenleber erreicht (HAGINO et al. 1968).

Daß dieser Anstieg durch eine Synthese von NAD über den PREISS-HANDLER-Weg zustande kommt, läßt sich durch einen ebenfalls bedeutenden Anstieg des NSAD-Spiegels beweisen (Maximum nach 4 - 9 Stunden, etwa 10 % des höchsten NAD-Wertes). Außerdem fand man eine gesteigerte Ribose- und Purinsynthese bei gleichbleibendem ATP-Spiegel. Offensichtlich wird durch die gesteigerte NAD-Synthese ATP verbraucht, wodurch die Ribose- und Adeninsynthese stimuliert wird (KAPLAN 1968).

Zusammen mit NSA verabreichte ^{14}C-Ribose wird zum größten Teil in den NMN-Anteil des NAD eingebaut (SHUSTER et al. 1958).

Die Annahme, daß das NAD allein über NSMN via PREISS-HANDLER aus NSA gebildet wird, scheint jedoch nur für große NSA-Dosen zu gelten. STREFFER (1968) injizierte Mäusen zunächst 120 mg ^{14}C-NSA kg intraperitoneal und konnte danach bei der autoradiografischen Auswertung von Chromatogrammen kein markiertes NMN nachweisen. Nach einer kleineren, im physiologischen Bereich liegenden Dosis NSA (0, 8 mg kg) fand er jedoch noch vor Auftreten von ^{14}C-NSAD autoradiografisch einen ^{14}C-NMN-Fleck und damit einen Hinweis darauf, daß in der Leber NAD aus NSA auch via NMN-Pyrophosphorylase entstehen kann. In welchem Umfang dieser Weg beschritten wird und warum er bei hohen NSA-Konzentrationen gehemmt scheint, ist noch unklar. HAGINO et al. (1968) konnten NMN bei ihren Leberperfusionsversuchen mit ^{14}C-NSA nicht nachweisen, auch nicht bei niedriger Dosierung des NSA.

Neben der gesteigerten Synthese ist aber noch ein weiterer Faktor für den NAD-Anstieg nach NSA-Injektionen verantwortlich. Es ist die bereits erwähnte Hemmung der NAD-Glykohydrolase durch NSA. Der im Anfang hohe NSA-Spiegel blockiert das abbauende Enzym und bildet damit die Voraussetzung für einen excessiven NAD-Anstieg durch Synthese aus NSA. Der NSA-Spiegel erreicht nach 10 - 12 Stunden wieder physiologische Werte. Die Blockierung der NAD-Glykohydrolase ist dann aufgehoben, und der NAD-Spiegel kann auch wieder zur Norm abfallen (KAPLAN 1968).

Während nach Verabreichung von NSA der Leber-NAD-Gehalt mit steigender Dosis größer wird (bis zu einem Maximum von etwa 3000 µg NAD/ g Leber nach 500 mg NSA/ kg), fand man für NS als Vorläufer eine optimale Dosis von 50 mg /kg. Appliziert man diese Dosis an Mäuse, so liegt nach einer Stunde der NAD-Anstieg mit 850 µg/ g Leber noch über dem durch eine gleiche Dosis NSA erreichbaren Spiegel (ca. 700 µg NAD/ g Leber). Vier Stunden p. i. von 500 mg NS/ kg misst man aber auch nur 850 µg NAD/ g Leber. Das sind etwa 2/5 des Wertes, der nach einer gleichen Dosis NSA gefunden wird (LANGAN et al. 1959).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß höhere Konzentrationen von NS zu einer Substrathemmung der NAD-Synthese führen, zumal der NSAD-Spiegel der Leber sich nur durch die oben angegebene optimale Dosis heben läßt. Bereits 100 mg NS/ kg lassen den NSAD-Spiegel unverändert. Ein weiterer Befund spricht für diese Hypothese. KAPLAN et al. (1957) zeigten, daß der nach hohen Dosen NSA zu erwartende Anstieg des Leber-NAD bei gleichzeitiger Verabreichung einer großen Dosis NS ausbleibt. Auch HAGINO et al. (1968) konnten diesen hemmenden Effekt der NS in ihren Leberperfusionsversuchen finden.

Kleinere Mengen NS (6 mg/kg) mehrmals in kürzeren Abständen (15 min) injiziert bringen den NAD-Spiegel der Leber auf Werte, wie sie nach einer einmaligen hohen Dosis NSA (500 mg/ kg) gemessen

werden (DIETRICH, Naturwissenschaften 1968).

Zur Untersuchung der Einbaugeschwindigkeit verschiedener Vorläufer injiziert man mit Isotopen markierte Verbindungen in möglichst kleiner Dosis und misst den Anstieg der Aktivität über dem NAD.

Interessante Unterschiede zwischen NSA und NS erbrachten die Versuche von HAYAISHI und Mitarbeitern (IJICHI et al. 1966). Sie injizierten Mäusen hohe Dosen (80 µmol) ^{14}C-NSA intraportal und untersuchten die Lebernucleotide auf Aktivität. Hierbei zeigte es sich, daß ein Aktivitätsanstieg im NAD erst nach ein bis zwei Stunden erfolgt. Einen grossen Teil der ^{14}C-Aktivität fand man zu dieser Zeit im Gastrointestinaltrakt, wo andererseits eine hohe Deamidase-Aktivität gemessen werden konnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der größte Teil des applizierten NSA von der Leber zunächst wieder an das Blut abgegeben wird und so in die verschiedenen Organe gelangt. In der Darmschleimhaut soll eine Anreicherung und Deamidation von NSA stattfinden. Die nun in die Leber gelangende NS wird auf dem PREISS-HANDLER-Syntheseweg in das NAD eingebaut, was am späten Anstieg von ^{14}C-NSAD und ^{14}C-NAD messbar ist.

Wesentlich schneller wird ^{14}C-NS nach intraportaler Injektion in das NAD der Leber und seine Vorstufen eingebaut. Bereits eine Minute p.i. von 78 mµmol erreicht die Radioaktivität im NSAD, nach 10 Minuten im NAD ihr Maximum. Nach vier Stunden läßt sich ^{14}C-Aktivität nur noch im NAD, NSA und NADP nachweisen.

In einem eigenen Versuch wurden einer Ratte 6 mg kg ^{14}C-NS intraperitoneal injiziert. Nach vier Stunden wurde die Leber entnommen und ein Perchlorsäureextrakt hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung des Extraktes mit anschließender Autoradiografie ergab drei Aktivitätsflecken, die durch mitlaufende Vergleichssubstanzen als NAD,

NSA und NADP identifiziert werden konnten.

In zwei weiteren Versuchen zur NAD-Biosynthese in Rattenleber wurden kleine Mengen ^{14}C-NS (65 und 90 mμmol) intraportal injiziert. Der erste Leberlappen wurde nach 15 Minuten abgetrennt und sofort aufgearbeitet. 73 % der Gesamtaktivität (= Summe der über NS, NSA, NSAD, NAD und NMN gemessenen Aktivität) fanden sich zu dieser Zeit bereits im NAD, weitere 17 % im NSA. NS, NMN und NSAD wiesen nur geringe ^{14}C-Aktivität auf. In Abständen von 30 Minuten wurden weitere Leberlappen entnommen, der letzte nach 105 Minuten. Die nach 15 Minuten gemessene Aktivitätsverteilung änderte sich nicht mehr wesentlich. Insbesondere blieb die über dem NAD-Fleck und dem NSA-Fleck bestimmte Aktivität zusammen bei 90 - 93 %, während die gesamte ^{14}C-Aktivität des Lebergewebes bezogen auf mμmol NAD über die ganze Versuchsdauer konstant blieb.

Der gegenüber dem schnellen Anstieg nur langsame ^{14}C-Abfall im NAD und NSA zusammen mit dem über 1, 5 Stunden nahezu konstant bleibenden ^{14}C-Spiegel des Lebergewebes läßt nach HAGINO et al. (1968), die an perfundierter Rattenleber entsprechende Ergebnisse erhielten, folgende Schlüsse zu :

1. Neu gebildetes NAD unterliegt sofort dem Angriff durch die NAD-Glykohydrolase, die ^{14}C-NSA freisetzt.

2. Nach einer gewissen Zeit ist der größte Teil des neu gebildeten NAD an Enzyme gebunden und damit relativ unempfindlich gegenüber der NAD-Glykohydrolase.

1. 4. Medikamenteneinfluß auf den NAD-Stoffwechsel

Wie ROITT (1956) nachwies, kann das als NAD-Glykohydrolase-Hemmstoff bekannte NSA den durch alkylierende Cytostatica hervorgerufenen NAD-Abfall und die damit verbundene Glykosehemmung verhindern.

Diesen schützenden Effekt vor alkylierenden Cytostatica beschrieben KUN et al. (1964) auch für 5-Fluor- und 5-Methylnikotinsäureamid. Beide Substanzen sind ebenfalls Inhibitoren der NAD-Glykohydrolase.

Es ist daher naheliegend, den Abfall des NAD-Spiegels unter Cytostatica auf eine Aktivierung der NAD-Glykohydrolase zurückzuführen.

HILZ et al. (1963) nehmen an, daß die primäre Wirkung cytostatischer Substanzen in der Schädigung eines aktiven Prinzipes der Zellmembran (NSA-Permease) liegt, als deren Folge dann eine Abnahme des intrazellulären NSA-Gehaltes und damit eine Enthemmung der NAD-Glykohydrolase eintritt. Einen Einfluß auf die Biosynthese des NAD konnten GRUNICKE et al. (1966) ausschließen.

Neben dem NSA gibt es einige weitere wirkungsvolle Hemmstoffe für das Enzym NAD-Glykohydrolase. Eine zehnfach stärkere Hemmwirkung als die von NSA fanden ZATMAN und Mitarbeiter (1954) beim Tuberculostaticum INH. Allerdings gibt es hier große Speziesunterschiede. Vögel und Wiederkäuer scheinen eine INH-empfindliche NAD-Glykohydrolase zu besitzen, bei Ratten und Mäusen findet man keinen Einfluß von INH auf das Enzym. Die Hemmung geht mit der Bildung des INH-Analogen des NAD einher.

Auf eine Beeinflussung des Koenzym-I-Stoffwechsels durch INH deuten auch folgende Befunde hin.

Füttert man Ratten fünf Wochen lang mit 500 mg INH-Zusatz pro Kg Futter, so steigt der Pyridinnucleotidgehalt der Leber um 49 % an. Zusätzliche NS-Gaben haben keinen Einfluß auf diesen Anstieg (ROSEN 1955).

BEKIERKUNST berichtete 1966 von einem NAD-Abfall um 56 % in Tuberkelbakterien (Typus humanus), die 48 Stunden mit 0,5 µg INH/ml inkubiert waren. Da INH keinen Einfluß auf die gereinigte Bakterien-

NAD-Glykohydrolase hatte, nahm der Autor an, daß INH in Tuberkelbakterien einen Inhibitor des Enzyms inaktiviert. Dieser Inhibitor wurde bereits in Abschnitt 1. 2. im Zusammenhang mit Befunden an B. subtilis erwähnt.

Im Widerspruch dazu stehen allerdings Untersuchungsergebnisse von WINDER und COLLINS (1968), die einen Anstieg der NAD-Konzentrationen um 70 % in Mycobacterium tub., Typus bovinus nach sechsstündiger Inkubation mit INH (10 µg/ml) feststellten.

Einen direkten Einfluß auf die NAD-Synthese hat dagegen die Substanz Azaserin. Sie hemmt nach PREISS und HANDLER (1958) die NAD-Synthetase, welche die Amidierung des NSAD zu NAD katalysiert. LANGAN et al. (1959) zeigten, daß unter Azaserin der nach NSA-Verabreichung zu erwartende NAD-Anstieg geringer ist und bei hoher Dosierung ganz ausbleibt, während der NSAD-Anstieg unbeeinflußt bleibt.

Eine weitere therapeutisch eingesetzte Substanz, das ß-Pyridylcarbinol, hat zur NAD-Synthese insofern eine Beziehung, als es in vivo von der Leber sehr schnell zu Nikotinsäure oxydiert wird. LANGAN et al. (1959) verglichen den Leber-NS-Gehalt von Mäusen nach Injektion von äquimolaren Mengen NS und ß-Pyridylcarbinol. Nach Pyridylcarbinol war dieser fast ebenso stark angestiegen wie nach NS. Die für hohe Dosen NS beschriebene Hemmung der NAD-Synthese gilt nach Versuchen von KAPLAN et al. (1957) auch für Pyridylcarbinol.

1. 5. Fragestellung

Die im letzten Abschnitt dargestellten Befunde ließen es berechtigt erscheinen, den Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den NAD-Stoffwechsel zunächst in Ascitestumorzellen und dann in Mäuseleberschnitten zu untersuchen.

Als Vorläufer für die NAD-Synthese wurde ^{14}C-markierte NS gewählt, da diese Substanz nach den bisherigen Ergebnissen -im Gegen-

satz zu NSA- sicher allein über eine Synthese via PREISS-HANDLER in das NAD eingeschleust wird.

Es wurde bei diesen Versuchen der ^{14}C-Einbau in die zellulären Nucleotide NSAD, NAD und NMN, sowie die Markierung des NSA untersucht. NMN liegt nicht auf dem PREISS-HANDLER-Weg, und es ist daher anzunehmen, daß es nur gering, nämlich über das gebildete NSA markiert wird.

2. Methoden

2.1. Enzymatische NAD-Bestimmung

Der Test nach WARBURG und CHRISTIAN (1936) beruht auf der vollständigen Reduktion des NAD durch die Alkoholdehydrogenase, wobei Äthanol im Überschuß vorhanden sein muß.

$$C_2H_5OH + NAD \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$$

Zur Bindung der gebildeten Protonen läßt man die Reaktion im alkalischen Milieu ablaufen. Der übliche Zusatz von Semicarbazid zur Bindung des entstehenden Aldehydes soll nach RACKER (1950) für die vollständige Reduktion nicht nötig sein.

Meßbar wird das reduzierte NAD im optischen Test durch einen dem oxydierten NAD fehlenden Absorptionsgipfel bei 340 nm. Bei der Bestimmung mit dem Eppendorf-Photometer wurde der Absorptionsanstieg bei 366 nm gemessen. Für diese Wellenlänge wird ein Extinktionskoeffizient von $3,3 \times 10^6$ cm^2/Mol angegeben (HOHORST 1956).

Verwendete Lösungen:

a) Natriumpyrophosphat-Semicarbazid-Puffer (pH 8, 7): 3, 3 g $Na_4P_2O_7 \times 10\ H_2O$, 0, 84 g Semicarbazid-HCl, 0, 17 g Glycin und 1, 0 ml Äthanol abs. werden in destilliertem Wasser gelöst und mit 2 n NaOH auf pH 8, 7 eingestellt. Mit destilliertem Wasser wird dann auf 100, 0 ml aufgefüllt.

b) ADH-Suspension (30 mg Protein/ml)

Testansatz :

1, 89-2, 89 ml Puffer
0, 10-0, 20 ml NAD-Probe
0, 01 ml Enzymsuspension

Testvolumen 2, 00 oder 3, 00 ml

Es wird die Absorption des Ansatzes bei 366 nm und einer Schichtdicke von einem Zentimeter gegen einen Pufferleerwert gemessen, und zwar dreimal :

E_1 vor Zugabe des Enzyms
E_2 nach Zugabe des Enzyms
E_3 nach wiederholter Zugabe von Enzym (Messung der Enzymeigenextinktion).

Für die Berechnung ergibt sich ΔE als Differenz der Extinktionen vor und nach der Enzymzugabe abzüglich der Enzymeigenextinktion.

ΔE ergibt dann unter Berücksichtigung der Volumina, der Schichtdicke und des molaren Extinktionskoeffizienten den NAD-Gehalt der Probe :

$$\frac{\Delta E \cdot V}{E \cdot d \cdot v} = \mu\text{mol NAD/ml Probe}$$

2. 2. Die Cyanid-Reaktion zur Bestimmung der oxydierten Pyridinnucleotide
(MEYERHOF 1938, COLOWICK et al. 1951)

Dieser Reaktion soll eine Anlagerung des Cyanid-Ions an das C-Atom 2 der quarternären Pyridinbase zugrunde liegen. Sie ist in 1 M KCN-Lösung (pH 11) in wenigen Minuten abgelaufen. Der Cyanidkomplex des NAD weist einen zusätzlichen Absorptionsgipfel bei 327 nm auf und fluoresziert, zeigt also Ähnlichkeit mit dem reduzierten NAD. Der Absorptionsgipfel des NSAD-Cyanidkomplexes liegt bei 315 nm.

Anwendung :

a) Löschflecke auf Chromatogrammpapier im UV-Licht können mit 1 molarer KCN-Lösung betupft und anschließend im UV-Licht auf Fluoreszenz geprüft werden.

b) Optischer Test zur Bestimmung der oxydierten Pyridinnucleotide

Ansatz : 3,00 ml 1 M KCN-Lösung
\+ 0,01 ml Probe

Messung der Extinktion nach fünf Minuten gegen KCN-Leerwert bei 334 nm im Eppendorf-Photometer.

Da es lediglich darauf ankam, während der NSAD-Synthese (Abschnitt 2.7.) einen Abfall der oxydierten Pyridinnucleotide durch hydrolytische Spaltung rechtzeitig zu erkennen, war eine quantitative Umrechnung nicht notwendig.

2.3. Die Keton-Fluoreszenz

Einige quarternäre Pyridinverbindungen lassen sich nach KODICEK et al. (1951) als bläulich-weiße Fluoreszenz auf Chromatogrammpapier nachweisen, wenn man das Papier vorher eine Stunde lang in einem geschlossenen Gefäß den Dämpfen eines Gemisches aus Methyläthyl-Keton und Ammoniak (1:1) ausgesetzt hat.

Dieser Nachweis gelingt bei NAD und NMN, nicht aber bei NSAD und NSMN. Offensichtlich ist die Amidgruppe eine Voraussetzung für das Gelingen der Keton-Reaktion.

2.4. Die Bromcyan-Reaktion

WANG et al. geben eine Cyanbromidlösung an, deren Dämpfen das Chromatogrammpapier eine Stunde ausgesetzt und anschließend mit 2%iger p-Aminobenzoesäure besprüht wird. Tertiäre Pyridinverbindungen sind dann durch ihre Farbreaktion unterscheidbar. Zur Lokalisation und Identifikation von NS, NSA, INH und Acetyl-INH auf Chromatogrammen wurde dieser Nachweis in vereinfachter Form verwendet.

Chromatogramme wurden Bromcyandämpfen ausgesetzt und anschliessend besprüht.

2.5. Papierchromatografie

Zur Trennung von Nucleotiden wurde als Laufmittel ein Gemisch aus Äthanol und 0,1 molarer Essigsäure (1:1) verwendet. Es wurde aufsteigend chromatografiert auf Papier Nr. 2043 b der Firma Schleicher & Schüll, Dassel.

2.6. Hochspannungselektrophorese

Für die Trennung von Nucleotiden wurde eine HE-Apparatur nach Wieland und Pfleiderer benützt. (Hersteller : Firma L. Hormuth und Vetter, Heidelberg-Wiesloch).

Die Trennung erfolgte bei pH 6,5 mit einem 1/15 molaren Phosphatpuffer nach Sörensen. Die Spannung betrug 1000-2000 Volt, die Trenndauer etwa zwei Stunden. Alle Nucleotide wanderten hierbei anodisch, ebenso die Nikotinsäure. NSA bewegte sich zur Kathode.

Alle Trennungen wurden auf MN-Chromatografiepapier Nr. 214 der Firma Machery & Nagel durchgeführt (Format 35 x 40 cm).

2.7. Synthese von Nikotinsäureadenindinucleotid (NSAD)

2.7.1. Präparation von NAD-Glykohydrolase aus Schweinehirn nach KAPLAN

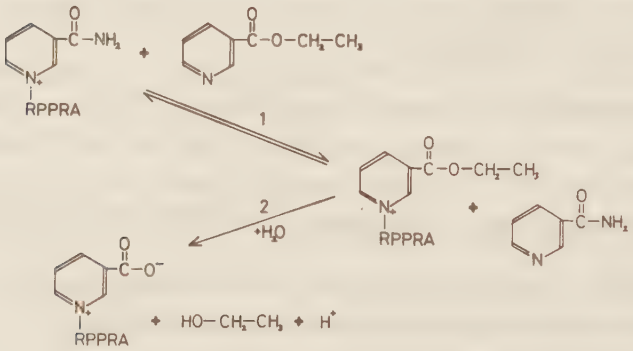
Das Enzym befindet sich in der unlöslichen Fraktion des Homogenates.

150 g frisches Schweinehirn wurden in 500 ml Eiswasser aufgenommen und mit einem Ultra-Turrax zehn Minuten homogenisiert. Nachdem das Homogenat ein Gazesieb passiert hatte, wurde es bei 20 000 g in einer Spinco-Ultrazentrifuge 20 Minuten zentrifugiert. Das Präzipitat kam in 300 ml Eiswasser und wurde nochmals bei 20 000 g geschleudert, diesmal 40 Minuten lang. Nun nahm man das Präzipitat in 150 ml

Eiswasser auf und setzte es 15 Minuten einer Ultraschallstrahlung aus. Schließlich wurde die Suspension bei 20 000 g 20 Minuten zentrifugiert, das Sediment verworfen, der kolloidale Überstand eingefroren.

2. 7. 2. Synthese des NSAD nach LAMBORG et al. (1958)

Bei der Synthese nach LAMBORG wird das NSA des NAD enzymatisch mit Hilfe der NAD-Glykohydrolase gegen Nikotinsäureäthylester ausgetauscht. Durch anschließende alkalische Hydrolyse des Esters entsteht NSAD, das Nikotinsäureanaloge des NAD.



NSAD-Synthese nach Lamborg

1, 0 g NAD wurde in einem Erlenmeyerkolben in aqua dest. gelöst und mit 1 n KOH neutralisiert. Dazu wurden 5, 0 ml 1/15 molarer Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7, 5, 2, 0 ml Nikotinsäureäthylester und 50 ml Schweinehirn-NAD-Glykohydrolase gegeben, und schließlich wurde der Reaktionsansatz auf 100, 0 ml mit Phosphatpuffer aufgefüllt. Diese Mischung kam zur Inkubation in ein Wasserbad von 37° C mit Schüttelvorrichtung. Nach jeweils 30 Minuten wurde eine Probe entnommen zur enzymatischen Bestimmung von NAD und zur

Bestimmung der gesamten oxydierten Pyridinnucleotide durch Messung der Absorption des Cyanid-Komplexes.

Im Laufe der Inkubation ließ die ADH-Reaktion einen zunächst linearen, dann langsameren Abfall des NAD erkennen, während die Cyanid-Reaktion eine über lange Zeit konstant bleibende Konzentration an oxydierten Pyridinnucleotiden anzeigte. Nach etwa vier Stunden nahm auch deren Konzentration langsam ab, was auf eine hydrolytische Spaltung der Nucleotide schließen ließ. Die Reaktion wurde dann gestoppt, indem das Reaktionsgemisch mit 1 n HCl auf pH 5, 0 gebracht und das Inkubationsgefäß für fünf Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt wurde. 12 % des eingesetzten NAD waren zu dieser Zeit nicht umgesetzt. Das gefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert, der Überstand bei 4^{o} C kaltgestellt.

Die Fällung der Nucleotide erfolgte durch Zugabe von vierfachem Volumen eiskalten Acetons. Über Nacht ließ man die gefällten Substanzen bei 4^{o} C sedimentieren. Der klare Acetonüberstand wurde abgegossen, das Sediment mit Diäthyläther gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck getrocknet.

2. 8. Trennung der NSAD-Syntheseprodukte nach Acetonfällung

2. 8. 1. Trennung durch Hochspannungselektrophorese

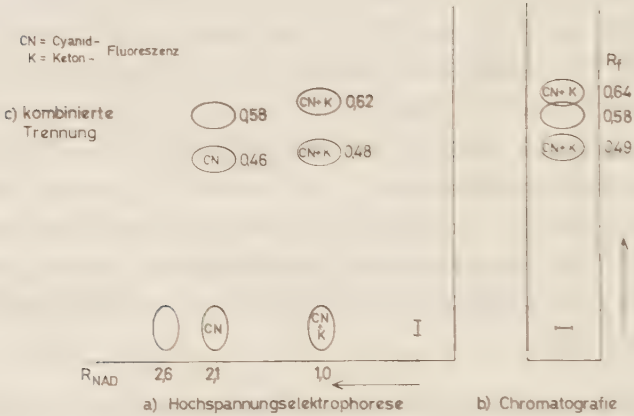
Bei 1200 Volt, 50 mA und pH 6, 5 wurde die Acetonfällung elektrophoretisch getrennt. Nach zwei Stunden fand man im UV-Licht drei Löschflecke mit R_{NAD}-Werten von 1, 0, 2, 1 und 2, 6, von denen der erste deutliche, der zweite geringe und der dritte keine KCN-Fluoreszenz zeigte.

2. 8. 2. Trennung durch Papierchromatografie

Die Trennung erfolgte aufsteigend. Als Laufmittel diente das in Abschnitt 2. 5. angegebene Gemisch.

Es ergaben sich im UV-Licht drei Löschflecke mit Rf-Werten von

0, 49, 0, 58 und 0, 64. Die Flecke mit Rf 0, 49 und 0, 64 zeigten Keton- und KCN-Fluoreszenz.



2. 8. 3. Kombinierte Trennung

Zunächst wurde, wie schon beschrieben, elektrophoretisch getrennt. Anschließend ließ man das Laufmittel für die chromatografische Trennung senkrecht dazu aufsteigen.

Die beiden durch Elektrophorese erhaltenen Löschflecke mit R_{NAD} 1, 0 und 2, 1 werden chromatografisch weiter aufgetrennt, während der Löschfleck mit R_{NAD} 2, 6 sich nicht mehr finden läßt. Dabei ergeben sich für den Fleck mit R_{NAD} 1, 0 zwei Löschflecke mit den Rf-Werten 0, 48 und 0, 62, die beide deutliche Ketonfluoreszenz zeigen.

Der Fleck mit R_{NAD} 2, 1 trennt sich chromatografisch ebenfalls weiter auf : Löschflecke mit Rf 0, 46 und 0, 58. Der erste zeigt

KCN-Fluoreszenz, jedoch keine Keton-Fluoreszenz, der zweite keinerlei Fluoreszenzreaktion.

2. 8. 4. Kombinierte Trennung nach alkalischer Hydrolyse

Nach alkalischer Hydrolyse der Acetonfällung (pH 9, 5 für 2-12 Stunden) findet man, daß der Löschfleck mit R_{NAD} 1, 0 mit zunehmender Hydrolysedauer schwächere Intensität zeigt und sich chromatografisch schließlich nur noch als ein Löschfleck mit Rf - 0, 48 darstellt, der die Keton- und KCN-Fluoreszenzreaktion gibt.

Die Intensität des Fleckes mit R_{NAD} - 2, 1 nimmt dagegen zu, ebenso die KCN-Fluoreszenz seines chromatografisch getrennten Anteiles mit Rf= 0, 46.

2. 8. 5. Beurteilung dieser Ergebnisse

Gegenüber den anderen Nucleotiden, die nach Ablauf der NSAD-Synthese im Reaktionsgemisch vorhanden sind (Nikotinsäureäthylester-Analoges des NAD und NAD) zeichnet sich das NSAD durch fehlende Keton-Fluoreszenz bei positiver Cyanid-Fluoreszenz aus (PREISS et al. 1958).

Einen Löschfleck mit diesem Verhalten ergibt die kombinierte Trennung (R_{NAD} - 2, 1. Rf - 0, 46). Seine Intensität nimmt nach alkalischer Hydrolyse zu.

Der Fleck mit R_{NAD} - 1, 0, Rf= 0, 48 weist sich durch Vergleich mit den entsprechenden Werten von reinem NAD als Koenzym I aus.

Es bleiben noch zwei Flecke zu identifizieren. Der eine (R_{NAD} = 1, 0, Rf - 0, 62) zeigt deutliche Cyanid- und Keton-Fluoreszenz und ist nach längerer alkalischer Hydrolyse nicht mehr nachzuweisen. Der zweite Löschfleck (R_{NAD} - 2, 1, Rf - 0, 58) zeigt keine Fluoreszenzreaktion und tritt mit zunehmender Hydrolyse stärker hervor.

Es liegt nahe, im ersten Fleck das Nikotinsäureäthylester-Analoge

des NAD, im zweiten die Adenosindiphosphatribose zu sehen, ein Nucleotidbruchstück, das sowohl enzymatisch durch die NAD-Glykohydrolase als auch durch Hydrolyse gebildet wird.

Diese Erklärung stimmt mit den von ANDERSON et al. (1959) veröffentlichten chromatografischen und elektrophoretischen Eigenschaften von in Stellung 3 substituierten Pyridinanalogen des NAD überein. Danach wandert die Mehrzahl der Analogen in einem chromatografischen System wie es auch in diesen Versuchen verwendet wurde mit gleichen Rf-Werten wie das NAD. Lediglich die Analogen mit einer Carbonylgruppe in Position 3 des Pyridinringes zeigen höhere Rf-Werte. Chromatografisch läßt sich also das NAD vom Nikotinsäureäthylester-Analogen,nicht jedoch vom NSAD trennen.

In der Hochspannungselektrophorese (0, 02 M Acetatpuffer pH 5, 4) wandern nach ANDERSON alle Koenzym-Analogen zur Anode, und zwar mit der gleichen Geschwindigkeit wie das NAD. Hier bildet nur das NSAD eine Ausnahme, das doppelt so weit läuft. Elektrophoretisch lassen sich demnach NSAD und NAD trennen.

Nicht trennen lassen sich dagegen auf diesem Wege ARPPR und NSAD. Für den in den folgenden Versuchen zu messenden Einbau von NS in Nucleotide ist dies jedoch unerheblich, da ARPPR keine NS enthält.

2. 9. Gewinnung von Ascites-Tumorzellen

Eine Maus mit einem 8-10 Tage alten Ascitestumor, die uns freundlicherweise vom Biochemischen Institut überlassen worden war, wurde dekapitiert und der Ascites mit einer Spritze abgenommen. Davon wurden je etwa 0, 2 ml gesunden weißen Mäusen eines NMR-Stammes intraperitoneal injiziert.

Die Mäuse bekamen altromin R-15 Mischfutter. Nach 10-12 Tagen wurden diese beimpften Mäuse getötet und der gewonnene Ascites nach

Zugabe von wenig Heparin für die Inkubationsversuche eingesetzt. Ascites, der makroskopisch blutig war, wurde verworfen. Das Zellvolumen bestimmte man in Hämatokritröhrchen. Es betrug 20 - 30 %.

2.10. Inkubationsversuche mit Ascitestumorzellen

2.10.1. Inkubationsansätze

Diese enthielten 5-15 % Ascitestumorzellen bei einem Endvolumen von 2 ml je Probe. Als Medium wurde zur Hälfte eine phosphatgepufferte calciumfreie Inkubationslösung verwendet, zur anderen Hälfte Ascitesserum.

Das Medium setzt sich wie folgt zusammen (RAUEN) :

20 ml Phosphatpuffer 0, 1 molar, pH 7, 4
(17, 8 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ + 20, 0 ml n HCl
ad 1000, 0 ml aqua dest.)
100 ml 0, 154 molare NaCl
4 ml 0, 154 molare KCl
1 ml 0, 154 molare KH_2PO_4
1 ml 0, 154 molare $MgSO_4 \times 7\ H_2O$

Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Glukose und L-Glutamin wurden in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt :

^{14}C-NS	5×10^{-6} M (mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM)
NSA	5×10^{-5} M
Glucose	5 mg/ ml
L-Glutamin	$3, 7 \times 10^{-3}$ M

Die für NS und NSA angegebenen Werte entsprechen nach FUSSGÄNGER et al. (1967) den in Asciteszellen gemessenen Konzentrationen.

Die Inkubation erfolgte in offenen Reagenzgläsern, die Temperatur des Wasserbades mit Schüttelvorrichtung betrug 37° C.

Die Endkonzentrationen von INH und ß-Pyridylcarbinol waren 10 mg/l, für ß-Pyridylcarbinol in einem Versuch auch 100 mg/l.

2.10.2. Aufarbeitung der Zellen

Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1500 r.p.m. (etwa 500 g) und vorsichtigem Abpipettieren des Mediums wurden die Tumorzellen mit 5%iger eiskalter Perchlorsäure aufgeschlossen. Das gefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert, der Überstand mit 1 n KOH neutralisiert, wobei besonders darauf zu achten war, daß pH 7 nicht überschritten wurde. Der neutralisierte Perchlorsäureextrakt blieb etwa 30 Minuten bei 4° C stehen, dann zentrifugierte man das ausgefallene Kaliumperchlorat scharf ab und engte den Überstand im Rotationsverdampfer bis zum trockenen Rückstand ein. Der trockene Extrakt wurde schließlich in 0,5 ml 1/15 molarem Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst.

2.10.3. Bestimmung des NAD-Gehaltes der einzelnen Proben

0,2 ml des gelösten Extraktes wurden zur enzymatischen NAD-Bestimmung eingesetzt.

2.10.4. Trennung des Perchlorsäureextraktes durch Hochspannungselektrophorese

0,02 ml des Extraktes jeder Probe wurden auf Elektrophoresepapier aufgetragen. Dazu kamen auf jeden Startfleck Vergleichssubstanzen, und zwar NS, NSA, NMN, NAD und NSAD-Syntheseprodukte nach LAMBORG, die neben NAD und NSAD auch ARPPR und das Nikotinsäureäthylester-Analoge des NAD enthielten.

Die einzelnen Substanzen konnten nach der Trennung als Löschflecke im UV-Licht lokalisiert werden. Auf einer gesonderten Bahn, die nur Vergleichssubstanzen führte, identifizierte man die Flecke mit Hilfe der beschriebenen Reaktionen (Abschnitte 2.2., 2.3. und 2.4.).

2.10.5. Bestimmung der ^{14}C-Aktivität des aufgetrennten Zellextraktes

Die im UV-Licht markierten Flecken, entsprechend NAD, NSAD, NMN, NS und NSA wurden ausgeschnitten und in Polyäthylenfläschchen gesteckt. Dazu wurden 15 ml Scintillationsflüssigkeit pipettiert. Diese enthielt 4 g PPO (= 2, 5-Diphenyloxazol) und 0, 1 g Dimethyl-POPOP (= 1, 4-Bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol) pro Liter Toluol.

Die Messung der Aktivität erfolgte in einem Packard Tricarb Liquid-Scintillationszähler, und zwar zehn Minuten pro Fläschchen. Ein Leerwert (HE-Papier von der Größe eines Löschfleckes) wurde mitgezählt und bei der Auswertung berücksichtigt.

Die so erhaltenen Aktivitätswerte (c. p. m.) wurden auf mμmol NAD bezogen.

Durch die Autoradiografie werden ^{14}C-Aktivitäten direkt sichtbar. Dazu werden die Elektrophoresepapiere auf möglichst empfindlichen Röntgenfilm gelegt, sodaß enger Kontakt zwischen beiden entsteht. Nach einigen Tagen findet man nach Entwicklung des Filmes Löschflecke mit ^{14}C-Aktivität als umschriebene Schwärzung auf dem Film wieder.

2.11. In vitro-Versuche mit Mäuseleber

2.11.1. Präparation von Leberschnitten

Es wurde die von DEUTSCH (1936) beschriebene Methode angewandt.

Die frisch entnommene Mäuseleber wurde in einer Petrischale auf Filterpapier ausgebreitet, das mit Phosphatpuffer getränkt war. Die Schale befand sich in einem Eisbad.

Ein Leberlappen wurde nun zwischen zwei Glasplatten gelegt, von denen die untere mit feuchtem Filterpapier bespannt, die obere mit Sandpapier aufgerauht war. Unter leichtem Druck auf die obere Platte führte man nun eine Rasierklinge hart am oberen Glas entlang. Die so gewonnenen Leberschnitte wurden sofort in eine durch Eiswasser gekühlte Petrischale gelegt. Vor der Inkubation bestimmte man das

Feuchtgewicht der einzelnen Schnitte.

Die Inkubation konnte etwa eine Stunde nach Leberentnahme beginnen.

2.11.2. Ansätze und Aufarbeitung

Die Leberschnitte schwammen während der Inkubation in dem unter Abschnitt 2.10.1. beschriebenen Medium mit den dort angegebenen Zusätzen. Die Aufarbeitung entsprach ebenfalls der für Asciteszellen beschriebenen.

2.12. In vivo-Versuche zur NAD-Biosynthese in Rattenlebern

Eine Ratte von etwa 250 g Körpergewicht wurde durch subcutane Injektion von 1 ml Cito-Eunarcon^{R} narkotisiert.

^{14}C-NS wurde nach Anlegen eines querverlaufenden Bauchschnittes intraportal verabreicht.

Die Dosis betrug 65 und in einem zweiten Versuch 90 mμmol NS in etwa einem Milliliter physiologischer Kochsalzlösung. Die spezifische Aktivität war 27,9 mC/mM Nikotinsäure.

Nach 15 Minuten und weiter in Abständen von 30 Minuten wurden einzelne Leberlappen abgebunden, abgetrennt, kamen sofort in zwei Volumen 5%iger eiskalter Perchlorsäure und wurden mit einem Glashomogenisator nach POTTER homogenisiert.

Die weitere Aufarbeitung entsprach dem unter Abschnitt 2.10. beschriebenen Vorgehen.

3. Untersuchungsergebnisse und deren Beurteilung

3.1. Versuche mit Ascitestumorzellen

3.1.1. Einbau von NS in Pyridinnucleotide

Der Einbau von ^{14}C-NS in NSAD, NAD und NMN sowie die Bildung

von ^{14}C-NSA wurde nach verschiedener Inkubationszeit gemessen. Da nur der NAD-Gehalt der Zellen, nicht jedoch der von NSAD, NMN, NS und NSA ohne größere Schwierigkeiten bestimmt werden konnte, wurden die Aktivitäten (c. p. m.) auf m/umol NAD bezogen. Dieser Quotient ist also nur für NAD gleich der spezifischen Aktivität der Substanz. Der NAD-Gehalt der Tumorzellen lag bei 250-300 m/umol/ ml und blieb während der ganzen Versuchsdauer nahezu konstant.

Die Aktivitätsverläufe je eines Quotienten sind in den nun folgenden Abbildungen 1-5 halblogarithmisch wiedergegeben. Es wurden insgesamt acht Versuche gemacht. Der Versuch 3 wird unter Abschnitt 3. 1. 2. gesondert besprochen.

Erläuterungen zu den Abbildungen 1 - 5

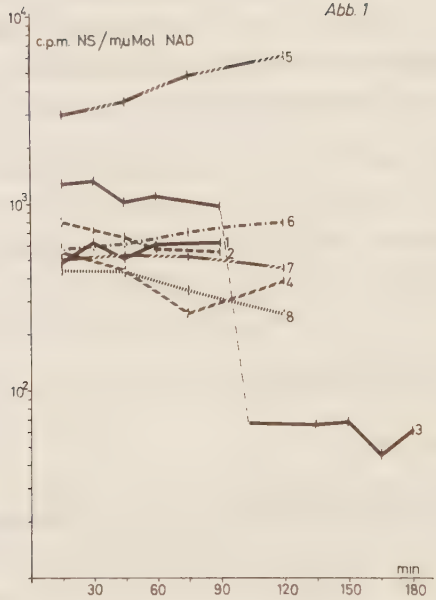
Zu Abb. 1 auf Seite 32 :

^{14}C-Aktivität der NS in Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Den Ansätzen war ^{14}C-NS berechnet auf eine Endkonzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM zugesetzt worden. Die nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit gemessene ^{14}C-Aktivität der intrazellulären NS wurde auf den in der gleichen Probe gemessenen NAD-Gehalt bezogen.

Die auffällige Streuung der Quotientenverläufe läßt auf unterschiedliche Versuchsbedingungen schließen. Dabei ist an unterschiedliche NS-Dosierungen und auch an Unterschiede im Alter und damit im Koenzymgehalt der Zellen zu denken. Auch war der Zellgehalt der Inkubationsproben wohl innerhalb eines Versuches konstant, schwankte aber bei verschiedenen Versuchen von 0, 10 bis 0, 29 ml dicht gepackter Zellen pro 2, 00 ml Ansatz.

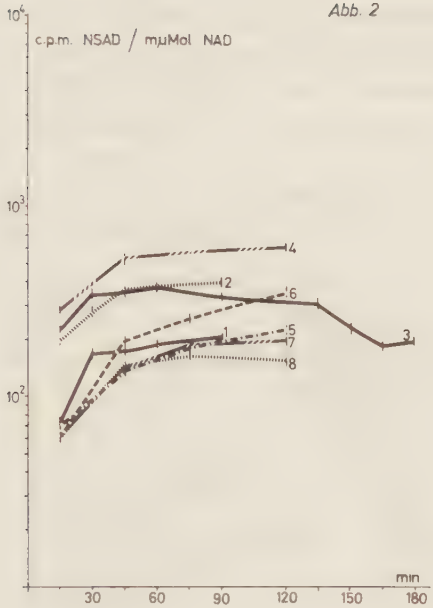
Abb. 1



Der Verlauf der Quotienten NS^+/ NAD zeigt in der Mehrzahl der Versuche nach schnellem Eindringen der NS in die Tumorzellen eine geringe Abnahme der intrazellulären NS-Aktivität, aus der ein Verbrauch von NS durch Einbau in Pyridinnucleotide zu folgern sein dürfte.

Für den Anstieg der Quotienten in den Versuchen 5 und 6 ist keine befriedigende Erklärung zu geben.

Zu Versuch 3 siehe unter Abschnitt 3. 1. 2.



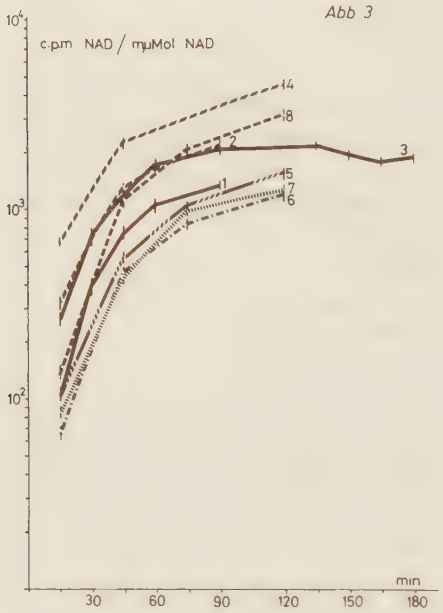
Zu Abb. 2

^{14}C-Aktivität des NSAD in Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Den Ansätzen war ^{14}C-NS berechnet auf eine Endkonzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM zugesetzt worden. Die nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit gemessene ^{14}C-Aktivität des intrazellulären NSAD wurde auf den in der gleichen Probe bestimmten NAD-Gehalt bezogen.

Die Quotientenverläufe zeigen alle einen steilen Aktivitätsanstieg in den ersten 45 Minuten. Später steigt die Aktivität im NSAD nur noch

gering oder bleibt bei dem erreichten Wert. Die schnelle Sättigung des NSAD läßt auf einen relativ kleinen Pool schließen, der eine frühe Station beim Durchfluß der NS zum NSA darstellt.
Zu Versuch 3 siehe unter Abschnitt 3. 1. 2.



Zu Abb. 3

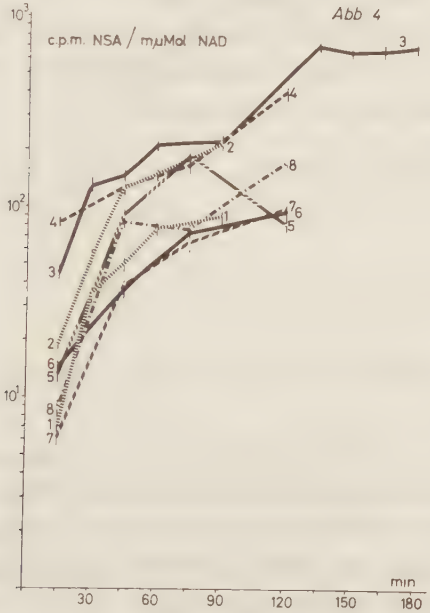
^{14}C-Aktivität des NAD in Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Den Ansätzen war ^{14}C-NS berechnet auf eine Endkonzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM zugesetzt worden. Die nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit gemessene ^{14}C-Aktivität des intrazellulären NAD wurde auf den in der gleichen Probe gemessenen NAD-Gehalt bezogen. Der errechnete Quotient ist

hier also gleich der spezifischen Aktivität des NAD zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die Aktivität steigt während der ganzen Versuchsdauer an, wobei aber der Anstieg der ersten 45 Minuten deutlich stärker ist als der der folgenden Zeit. Der Quotient strebt in allen Versuchen einem Maximum zu, das durch die NS-Konzentration und die spezifische Aktivität der NS bestimmt wird.

Zu Versuch 3 siehe unter Abschnitt 3. 1. 2.



Zu Abb. 4

^{14}C-Aktivität des NSA in Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Den Ansätzen war ^{14}C-NS berechnet auf eine Endkonzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC mM zugesetzt worden. Die nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten gemessene ^{14}C-Aktivität des intrazellulären NSA wurde auf den in der gleichen Probe bestimmten NAD-Gehalt bezogen.

Zu beachten ist hier der gegenüber den Abb. 1-3 um eine Zehnerpotenz verschobene logarithmische Maßstab der Ordinate. Die Aktivitätsquotienten liegen also um etwa eine Zehnerpotenz niedriger als die von NAD. Außerdem zeigen die Verläufe stärkere Schwankungen auch innerhalb eines Versuches, was auf ungenaue Messung schließen läßt. Dies ist mit der geringen absoluten Aktivität der NSA-Flecke auf dem Pherogrammpapier zu erklären. Bei abnehmender Zählausbeute wird die Fehlerquote der Scintillationsmessung größer. Ein Aktivitätsanstieg wird immerhin auch für das NSA deutlich.

Zu Versuch 3 siehe unter 3. 1. 2.

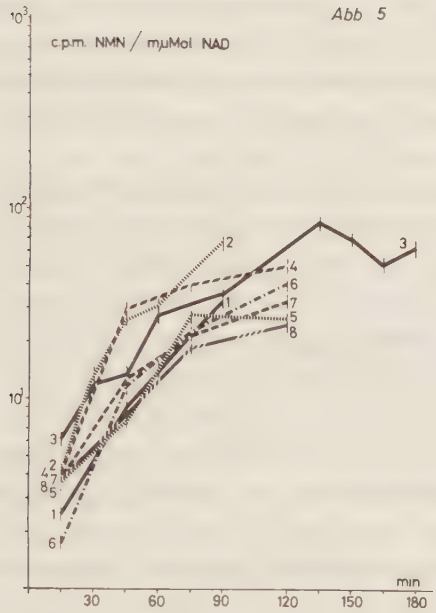
Zu Abb. 5 auf Seite 37 :

^{14}C-Aktivität des NMN in Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Den Ansätzen war ^{14}C-NS berechnet auf eine Endkonzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC mM zugesetzt worden. Die nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit gemessene ^{14}C-Aktivität des intrazellulären NMN wurde auf den in der gleichen Probe bestimmten NAD-Gehalt bezogen.

Auch hier ist der gegenüber den Abb. 1-3 um eine Zehnerpotenz verschobene logarithmische Maßstab der Ordinate zu beachten.

Die Aktivitätsquotienten liegen um etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als die von NAD.



Trotz der geringen Aktivität wird doch eine zunehmende Markierung des NMN durch ^{14}C-NS deutlich. Der NMN-Pool der Zelle ist offensichtlich nur klein und steht am Ende des Durchflusses der ^{14}C-NS. Zunächst muß die NAD-Glykohydrolase ^{14}C-NAD abbauen, dann erst kann die NMN-Pyrophosphorylase NMN mit ^{14}C-NSA markieren.

Zu Versuch 3 siehe unter Abschnitt 3. 1. 2.

3.1.2. Abfall der intrazellulären ^{14}C-Aktivitäten nach Austausch der ^{14}C-NS im Medium gegen nichtmarkierte Nikotinsäure

Im Versuch 3 wurde nach 90 Minuten die ^{14}C-NS im Medium gegen inaktive NS gleicher Konzentration ausgetauscht, indem die Zellen abzentrifugiert und dreimal in einem zweiten Medium gewaschen wurden, das sich vom ersten dadurch unterschied, daß die NS inaktiv war. In diesem Medium erfolgte dann die weitere Inkubation.

Aus Abb. 1 ist zu ersehen, daß der Quotient NS^+/NAD nach 135 Minuten Gesamtinkubationsdauer auf weniger als ein Zehntel des Ausgangswertes gesunken ist. Berücksichtigt man allerdings, daß die Zellen nach dreimaligem Waschen in ^{14}C-freiem Medium in etwa dem zehnfachen Volumen diesen Mediums aufgenommen wurden, müßte man eine geringere intrazelluläre ^{14}C-NS-Konzentration erwarten. Dem schnellen Eindringen der NS in die Tumorzellen (HOLZER et al. 1961) steht offensichtlich das langsamere Austrittsvermögen gegenüber. Es stellt sich demnach hier die Frage, ob ein Teil der intrazellulären NS an Membranen oder Enzyme fixiert wird und damit nicht mehr gegen freie NS des umgebenden Mediums ausgetauscht werden kann.

Der Quotient $NSAD^+/NAD$ erreicht nach 180 Minuten wieder den Wert wie nach 15 Minuten (Abb. 2).

Dagegen fällt die spezifische Aktivität des NAD nach dem Mediumwechsel nur gering (Abb. 3).

Die Abb. 4 und 5 schließlich zeigen einen weiteren Anstieg der Quotienten NSA^+/NAD und NMN^+/NAD, obwohl die aktive NS ausgetauscht ist.

Diese Ergebnisse lassen zunächst einmal Rückschlüsse auf die intrazellulären Pool-Größen von NSAD und NAD zu. Bei gleichgroßen und gleichbleibenden Synthese- und Abbauraten verliert eine Substanz umso schneller wieder eine durch Einbau erreichte Aktivität, je klei-

ner ihr Pool in der Zelle ist. Der langsame Aktivitätsverlust im NAD läßt daher auf einen relativ großen NAD-Pool, der schnelle Verlust an ^{14}C-Aktivität im NSAD auf einen relativ kleinen NSAD-Pool schliessen.

Das Verhalten der Quotienten NSA^+/NAD und NMN^+/NAD nach Mediumwechsel läßt sich folgendermapen erklären. Während der Einbau von ^{14}C-NS-Molekülen in NSAD und NAD abnimmt - entsprechend dem nach Ersetzen der aktiven durch inaktive NS eingetretenen starken extrazellulären und weniger stark ausgeprägten intrazellulären Abfall der spezifischen Aktivität der NS -, stellen die nach 90 Minuten vorhandenen ^{14}C-markierten NAD-Moleküle einen größeren Pool dar, aus dem mit Hilfe der NAD-Glykohydrolase ^{14}C-NSA freigesetzt werden kann. Also steigt die spezifische Aktivität des NSA und in der Folge auch die des NMN weiter an bis sie nach etwa 135 Minuten einen Sättigungswert erreicht haben (Abb. 4 und 5).

Aus der Abnahme der spezifischen Aktivität des NAD läßt sich unter folgenden Voraussetzungen die Turnover-Zeit errechnen (ZILVERSMIT et al. 1943).

1. Es muß sich um ein steady-state handeln, d. h. der Gehalt der untersuchten Zellen an NAD muß konstant und damit die Syntheserate gleich der Abbaurate sein.

2. Synthese- und Abbaurate müssen während des Versuches konstant bleiben.

3. Es darf beim Abbau der NAD-Moleküle keine Auswahl erfolgen, d. h. der Abbau von aktiven und inaktiven NAD-Molekülen muß im Verhältnis der spezifischen Aktivität des NAD erfolgen, der Abbau muß also zufällig sein.

4. Es darf keine weitere Markierung des NAD auf dem Syntheseweg erfolgen.

Obwohl die letzte Voraussetzung nicht erfüllt ist, da ja noch weiter ^{14}C-NSAD-Moleküle amidiert werden, haben wir die Berechnung durchgeführt.

Bezeichnet man mit p die Abbaurate des NAD, mit NAD die Gesamtmenge an NAD und mit NAD^+ die Menge an markierten NAD-Molekülen (gemessen in c. p. m.), so ergibt sich folgende Gleichung für den NAD-Turnover :

$$\frac{d\,NAD}{dt} = - p \frac{NAD^+}{NAD} \quad .$$

Nach Integration erhält man :

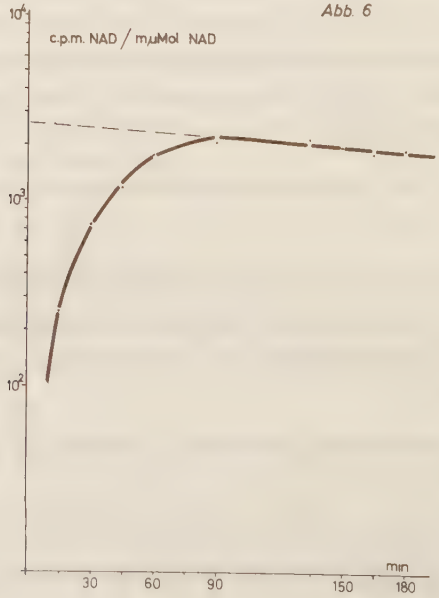
$$\frac{NAD^+}{NAD} = \text{const.} \cdot e^{-\frac{p}{NAD} t}$$

oder nach Einführen des natürlichen Logarithmus :

$$\ln \frac{NAD^+}{NAD} = \ln \text{const.} - \frac{p}{NAD} t \quad .$$

Die letzte Gleichung läßt erkennen, daß man beim Auftragen von $\ln \frac{NAD^+}{NAD}$ in Abhängigkeit von der Zeit eine Gerade erhält, deren Anstieg $-\frac{p}{NAD}$ ist. Da $\ln a = \log a \cdot 2,3025$ ist, muß diese Gerade auch im semilogarithmischen Koordinatensystem erscheinen, was Abb. 6 bestätigt.

Abb. 6



Der Anstieg beträgt tan = $\frac{0,100}{53,75} = 1,86 \times 10^{-3}$. Daraus läßt sich eine Turnover-Rate von 30 mμmol NAD/ ml Zellen/ h errechnen, wenn man von einem NAD-Gehalt der Zellen von 250 - 300 mμmol/ ml ausgeht.

Der Kehrwert des Anstieges gibt die Turnover-Zeit : 537 Minuten oder etwa 9 Stunden.

Dieser Wert liegt höher als der von GRUNICKE et al. (1966). Diese Autoren bestimmten aus dem Anstieg der spezifischen Aktivitäten von NSAD und NAD und dem Einbau von NSA über NMN in das NAD eine Turnover-Zeit von 5, 5 - 6, 5 Stunden.

Ein wesentlicher Grund für die längere Turnover-Zeit, die wir aus dem Abfall der spezifischen Aktivität des NAD errechnet haben, ist wohl in der schon erwähnten fortgesetzten Amidierung von noch vorhandenen ^{14}C-NSAD-Molekülen zu suchen.

Ein weiterer Grund dürfte sein, daß durch Abbau von NAD entstehendes markiertes NSA wieder zur Synthese von NAD über die NMN-Pyrophosphorylase verwendet und damit der Aktivitätsabfall im NAD ebenfalls verzögert wird.

Theoretisch muß auch noch folgende Fehlermöglichkeit in Betracht gezogen werden. Durch die NAD-Glykohydrolase wird nicht nur NAD hydrolytisch gespalten, sondern es werden auch NSA-Moleküle ausgetauscht. Das Enzym ist bei den verwendeten physiologischen NSA-Konzentrationen etwa zu 40 % gehemmt (HILZ et al. 1963). Hierdurch könnte ein zu schneller Abbau vorgetäuscht werden, wenn unmarkierte NSA-Moleküle an die Stelle von ^{14}C-markierten treten. Da aber nach 135 Minuten sich die spezifischen Aktivitäten von NSA und NAD einander angeglichen haben, führt ein Austausch von NSA-Molekülen nicht mehr zu einer Änderung der spezifischen Aktivität des NAD. Diese wird dann nur noch durch Auf- und Abbau bestimmt.

Auch unter Berücksichtigung der schon erwähnten Vorbehalte bezüglich der Voraussetzungen dieser Berechnung läßt sich in Übereinstimmung mit GRUNICKE et al. die Aussage machen, daß die NAD-Turnover-Zeit in Ascites-Tumorzellen im Bereich von mehreren Stunden liegt und nicht nur etwa eine Stunde beträgt, wie zunächst von anderen Autoren angenommen wurde (KRÖGER et al. 1960).

3.1.3. Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide

Den in Abschnitt 3.1.1. dargestellten Versuchen liefen zum Teil (Versuche 5-8) Inkubationsansätze parallel, deren Medium INH oder ß-Pyridylcarbinol in einer Konzentration von 10 µg/ ml oder 100 µg ml enthielten, deren Zellen sonst aber unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden wie die Leeransätze. Die Zellen für Leer- und Parallelversuch wurden einem Ascitesgemisch entnommen, das durch Punktion mehrerer Mäuse gleichen Ascitesalters gewonnen worden war.

Die Ergebnisse der vier Versuche sind in den Abbildungen 7-10 auf den Seiten 43-46 wiedergegeben.

Bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse ergibt sich für NSAD und NAD eine gute Übereinstimmung in allen Leer- und Parallelversuchen, während die NSA- und NMN-Quotienten Abweichungen zeigen, für die in der Erläuterung zu Abb. 4 (Seite 36) bereits eine Erklärung gegeben wurde, und die wohl nicht auf Medikamenteneinfluß zurückzuführen sein dürften.

Berücksichtigt man weiter, daß der NAD-Gehalt von Leer- und Parallelansätzen keine Unterschiede zeigte, so läßt sich ein Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf die NAD-Biosynthese aus NS in Ascitestumorzellen ausschließen.

Eine Hemmung der NAD-Glykohydrolase bei gleichbleibendem NAD-Gehalt der Zellen müßte sich in einem verminderten NS-Einbau,

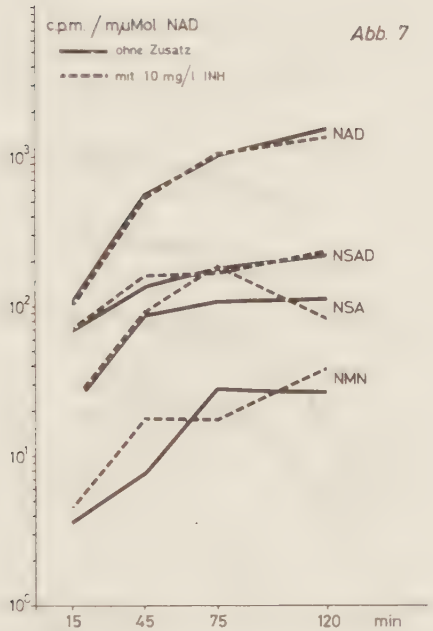


Abb. 7

Einfluß von INH auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide und die Bildung von ^{14}C-NSA in Ascitestumorzellen

Beide Ansatzreihen enthielten ^{14}C-NS in einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM, einer Ansatzreihe waren außerdem 10 μg/ml INH zugesetzt.

Die Quotienten NAD^+/NAD und $NSAD^+$/NAD zeigen gute Übereinstimmung in Leer- und Parallelversuch, während die Quotienten NSA^+/NAD und NMN^+/NAD geringe Abweichungen zeigen.

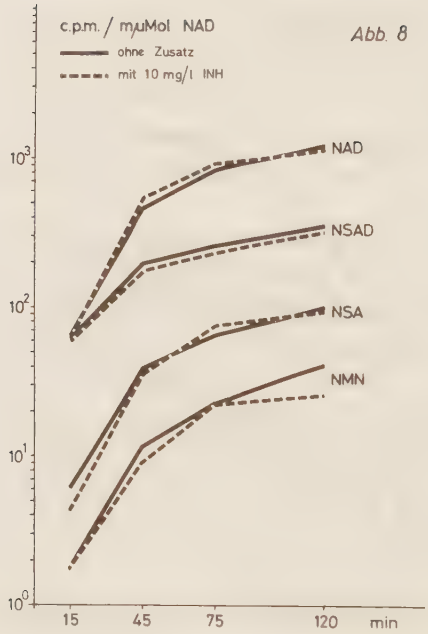


Abb. 8

Einfluß von INH auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide und die Bildung von ^{14}C-NSA in Ascitestumorzellen

Beide Ansatzreihen enthielten ^{14}C-NS in einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/ mM, einer Ansatzreihe waren außerdem 10 µg/ ml INH zugesetzt.

Gute Übereinstimmung aller vier Quotienten in Leer- und Parallelversuch mit Medikamentenzusatz.

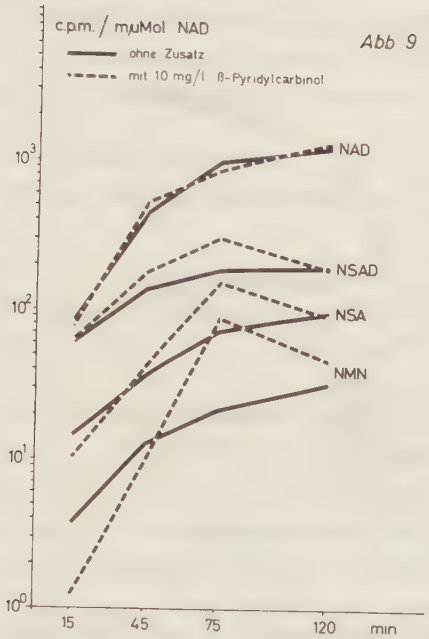


Abb. 9

Einfluß von ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide und auf die Bildung von ^{14}C-NSA in Ascitestumorzellen

Beide Ansatzreihen enthielten ^{14}C-NS in einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/mM, einer Ansatzreihe waren 10 µg/ml ß-Pyridylcarbinol zugesetzt.

Der Medikamentenzusatz zeigt auf den Verlauf der spezifischen Aktivität des NAD keinen Einfluß. Der 75-Minutenwert der Quotienten $NSAD^+$/NAD, NSA^+/NAD und besonders NMN^+/NAD fällt ganz aus der Reihe. Hier muß offensichtlich ein Messfehler vorliegen.

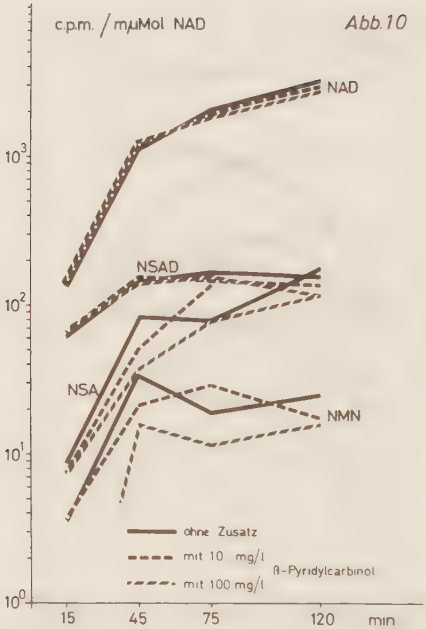


Abb. 10

Einfluß von ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in Pyridinnucleotide und auf die Bildung von ^{14}C-NSA in Ascitestumorzellen

Dieser Versuch bestand aus drei Ansatzreihen. Neben dem Leerversuch zwei Parallelversuche mit 10 µg/ml und 100 µg/ml ß-Pyridylcarbinol. Alle Ansatzreihen enthielten ^{14}C-NS in einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/mM.

Keine der beiden Konzentrationen des Medikamentes zeigt einen Einfluß auf den Verlauf der spezifischen Aktivität des NAD und des Quotienten $NSAD^+/NAD$. Abweichungen sind lediglich wieder im Verlauf der Quotienten NSA^+/NAD und NMN^+/NAD zu erkennen. Eine eindeutige Tendenz unter Medikamenteneinfluß besteht jedoch nicht.

eine Hemmung oder Aktivierung der Synthese in einem langsameren bzw. schnelleren Anstieg der spezifischen Aktivität des NAD zu erkennen geben. Auch eine enzymatische Oxydation von ß-Pyridylcarbinol wie in Leberzellen findet man in Asciteszellen nicht.

3. 2. Versuche mit Mäuseleberschnitten

Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in das NAD

Zwei Inkubationsversuche mit je einer Leeransatzreihe und zwei Parallelansatzreihen wurden durchgeführt. Die beiden Parallelansätze enthielten 10 µg/ml INH bzw. 10 µg/ml ß-Pyridylcarbinol.

Anders als in den Versuchen mit Asciteszellen konnte hier in Leer- und Parallelansätzen ein deutlicher, von der Inkubationsdauer abhängiger NAD-Abfall in den Leberschnitten nicht vermieden werden. Dies läßt auf eine zunehmende Schädigung oder Zerstörung von Leberzellen schließen und erschwert eine Beurteilung des Medikamenteneinflusses.

Ein aliquot eines jeden Perchlorsäureextraktes wurde zur Messung der Gesamtaktivität und ein weiteres aliquot zur elektrophoretischen Trennung der Nucleotide mit anschließender Messung der Aktivität über dem NAD-Fleck eingesetzt. Der Anteil dieser NAD-Aktivität an der Gesamtaktivität wurde dann berechnet, und die Mittelwerte aus zwei Versuchen in ein Koordinatensystem gebracht, auf dessen Abszisse die Inkubationsdauer abgetragen ist. (Abb. 11 auf Seite 48).

Für die Leeransätze sowie für die Ansätze mit 10 µg/ml INH erhält man einen Anstieg des NAD-Anteiles an der Gesamtaktivität, der nach zwei Stunden einen Wert von etwa 35 % erreicht hat. Dagegen sind in den ß-Pyridylcarbinol-Ansätzen nach zwei Stunden weniger als 10 % der Gesamtaktivität im NAD zu finden. Dies liegt auch weit außerhalb der Streuung der Leerversuche.

Die Deutung dieser Ergebnisse liegt nahe, wenn man berücksich-

tigt, daß ß-Pyridylcarbinol in Leberzellen zu Nikotinsäure oxydiert werden kann (LANGAN et al. 1959). Die spezifische Aktivität der in den NAD-Zyklus eingeschleusten Nikotinsäure wird dadurch vermindert. Daraus resultiert eine kleinere Einbaurate von ^{14}C-NS-Molekülen in das NAD.

Ein Einfluß von INH auf die NAD-Biosynthese aus NS konnte dagegen auch für Mäuseleberzellen in vitro nicht festgestellt werden.

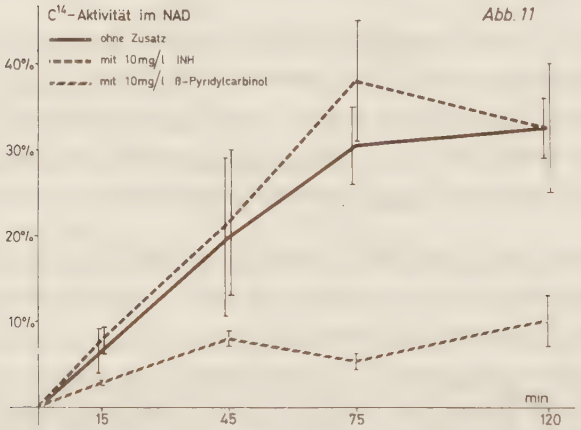


Abb. 11

Einfluß von INH und ß-Pyridylcarbinol auf den Einbau von ^{14}C-NS in das NAD von Mäuseleberschnitten

Alle Ansätze enthielten 5×10^{-6} M ^{14}C-NS mit einer spezifischen Aktivität von 27, 9 mC/mM.

Genaue Erläuterungen zum Versuch finden sich im Text.

4. Zusammenfassung

Für Ascitestumorzellen konnte eine Turnover-Zeit des NAD von etwa neun Stunden bestimmt werden.

Bei diesen Zellen hat weder INH noch ß-Pyridylcarbinol einen Einfluß auf die NAD-Biosynthese.

Bei Mäuseleberschnitten wird ein solcher Einfluß von ß-Pyridylcarbinol vorgetäuscht, wenn man die NAD-Biosynthese am Einbau von radioaktiv markierter Nikotinsäure mißt. Die enzymatische Oxydation des Medikamentes zu Nikotinsäure bewirkt eine Verdünnung der ^{14}C-markierten Nikotinsäure.

II. Teil

Untersuchungen über den Einfluß des Diphenylhydantoin auf die enzymatische Acetylierung des Isonikotinsäurehydrazid

1. Einleitung und Fragestellung

Von den zahlreichen INH-Metaboliten ist das N-Isonicotinoyl-N' - acetyl-hydrazin beim Menschen der quantitativ bedeutendste (KRÜGER-THIEMER). 1953 fand Hettie HUGHES dieses INH-Derivat im Urin von Affen, denen INH verabreicht worden war. 50 - 90 % des verabreichten INH werden nach diesen Befunden als Acetyl-INH ausgeschieden.

Bald darauf konnten DEFRANCESCHI und ZAMBONI (1954) den Metaboliten in Rattenurin und MAKINO et al. (1954) im Menschenurin nachweisen. Beide Forschergruppen benutzten zur Trennung der Metaboliten die Papierchromatografie und beschrieben auch das UV-Absorptionsspektrum des Acetyl-INH.

Den Verlauf der enzymatischen Acetylierung des INH gibt folgendes Reaktionsschema wieder, das mit den aus kinetischen Studien gewonnenen Werten übereinstimmt (JENNE et al. 1962) :

$$E + AcCoA \underset{K-1}{\overset{K\,1}{\rightleftharpoons}} E\text{-}AcCoA$$

$$E - AcCoA \underset{K-2}{\overset{K\,2}{\rightleftharpoons}} AcE + CoA$$

$$AcE + INH \underset{K-3}{\overset{K\,3}{\rightleftharpoons}} AcE - INH$$

$$AcE - INH \underset{K-4}{\overset{K\,4}{\rightleftharpoons}} AcINH - E$$

$$AcINH - E \underset{K-5}{\overset{K\,5}{\rightleftharpoons}} AcINH + E$$

Nach Applikation von INH an Menschen zeigen sich auffallende Unterschiede im Verlauf der Blutspiegelkurven. Die Ausscheidung von unverändertem INH im Urin schwankt außerdem zwischen 1, 5 und 37 %

(BÖNICKE 1952). Nach BÖNICKE unterscheidet man danach Langsamausscheider mit einer INH-Halbwertszeit um 180 Minuten und einer relativ hohen Ausscheidungsrate von freiem INH im Urin von Schnellausscheidern mit einer INH-Halbwertszeit um 90 Minuten und einer niedrigeren Ausscheidungsrate von freiem INH. Hierbei handelt es sich um einen genetisch bedingten Polymorphismus (Zusammenfassung und Literatur bei GOEDDE et al. 1968).

GOEDDE et al. (1964) untersuchten nun die INH-Blutspiegel bei Cercopithecus aethiops. Nachdem sie auch hier Langsam- und Schnellausscheider gefunden hatten, inkubierten sie eine aus Affenlebern gewonnene Enzympräparation mit INH und Acetyl-Koenzym A. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen INH-Blutspiegel und der Aktivität der Leberacetylase. Die Enzympräparation von Langsamausscheidern zeigte eine geringere Acetylierungsaktivität als die von Schnellausscheidern.

Die nach den bisher bekannten Ergebnissen naheliegende Vermutung, daß die Unterschiede im Verlauf der INH-Blutspiegel auf eine genetisch bedingte unterschiedliche Acetylierungsfähigkeit der Leber zurückzuführen ist, wurde durch diese Versuche bestätigt.

Die Acetylierung des INH läßt sich durch aromatische und heterocyclische Amine, Amide und Hydrazine hemmen, und INH hemmt seinerseits die Acetylierung von Sulfonamiden.

Die Frage, ob auch das Antiepileptikum Diphenylhydantoin einen hemmenden Einfluß auf die enzymatische INH-Acetylierung hat, drängt sich auf, wenn man die Untersuchungsergebnisse von DOLD (1970) an Patienten der Tübinger Medizinischen Klinik betrachtet. Unter einer Kombinationstherapie von INH und DPH kam es bei mehreren Patienten zu einem Anstieg der Transaminasen im Serum, der auf eine Leberzellschädigung hinwies. Histologisch konnte gelegentlich eine unspezifische Entzündung mit Leberzellnekrosen gefunden werden. Setzte

man eines der Medikamente ab, gingen die Serumtransaminasen in den Normbereich zurück. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die INH-Halbwertszeiten bei gleichzeitiger Verabreichung von DPH bei einigen Patienten verlängert waren.

Die im folgenden Teil beschriebenen Versuche sollten die Frage klären helfen, ob dieser verzögerte Abfall der INH-Blutspiegel bei INH-DPH-Kombinationstherapie auf eine verminderte Acetylierung zurückzuführen ist.

2. Methoden

2.1. Sprühreaktionen zur Identifikation von Ac-INH und INH auf Chromatogrammen

2.1.1. Ferroatsprühtest

Natriumpentacyanoamminferroat, $Na_3\,[Fe(CN)_5NH_3]$ in wässriger Lösung kann als Sprühreagenz auf Isonikotinsäurerederivate verwendet werden. Das Reagenz läßt sich folgendermaßen darstellen :

25 g Natriumpentacyanonitrosoferroat werden mit 75 ml konzentriertem Ammoniak übergossen und 24 Stunden im Eisbad stehengelassen. Das gelbe Reagenz scheidet sich nach Verdünnen mit absolutem Alkohol ab. Es wird mit absolutem Äthanol nachgewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet (KRÜGER-THIEMER).

1 g des gelben Puders wird in 100 ml Wasser gelöst und als Sprühreagenz benutzt.

2.1.2. Silbernitrat-Ammoniak-Sprühtest

Freie Hydrazingruppen reduzieren ammoniakalische Silbernitratlösung. Ac-INH gibt einige Minuten nach Aufsprühen des Ammoniaks eine flüchtige, schwache Gelbfärbung.

Reagenzien :

Wässrige Silbernitratlösung (5 g/100 ml)

Ammoniaklösung (10 g/100 ml)

Empfindlichkeit der Farbreaktionen (nach KRÜGER-THIEMER)

	Ferroat	$AgNO_3$ + NH_3
INH	6 µg, orange-gelb mit grauem Rand	6 µg, braun-schwarz
Ac-INH	3 µg, orange	50 µg, gelb
iso-NS	12 µg, gelb	---

2.2. Trennung von Ac-INH und INH durch Papierchromatografie

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Isopropanol und Wasser im Verhältnis 85 : 15 verwendet. Es wurde durchweg aufsteigend auf Papier Nr. 2043 Mgl der Firma Schleicher & Schüll, Dassel bei Zimmertemperatur chromatografiert.

Rf-Werte im System
Isopropanol und Wasser (85:15)

	eigene Werte	Vergleichswerte von KRÜGER-THIEMER
INH	0, 60	0, 52
Ac-INH	0, 76	0, 65
iso-NS		0, 32
N', N' -Diisonicotinoyl-hydrazin		0, 64
	aufsteigend	absteigend
	chromatografiert	

2.3. Trennung von Ac-INH und INH durch Hochspannungselektrophorese

Es wurde mit Puffern verschiedener Protonenkonzentration versucht, das Ac-INH elektrophoretisch vom INH zu trennen. Mit einem Natriumborat-Salzsäure-Puffer, pH 8, 85 erreichte man eine gute Trennung beider Substanzen, und zwar wanderte unter diesen Bedingungen das INH zur Kathode, Ac-INH und Nikotinsäure zur Anode.

Bei einer Trenndauer von 90 Minuten und einer Spannung von 1400 Volt wurden folgende Strecken zurückgelegt :

INH	- 1, 5 cm
Ac-INH	+ 3, 5 cm
NS	+ 10, 5 cm.

Bei pH-Werten von 8, 5 und darunter wanderten Ac-INH und INH zur Kathode. Die Trennung war dabei durchweg unzureichend.

Als Nebenbefund ergab sich eine bläuliche Fluoreszenz im UV-Licht bei den Ac-INH-Flecken nach Trocknen des Elektrophoresepapiers.

Elektrophoreseapparatur und Papier waren die gleichen wie unter Methoden zu Teil I beschrieben.

2. 4. Versuch des Nachweises von ^{14}C-Ac-INH nach Inkubation von Ascitestumorzellen und Mäuseleberschnitten mit ^{14}C-INH

Es wurde nach einem acetylierungsfähigen System gesucht, mit dem ein Einfluß von DPH bestimmbar ist.

Die Inkubationsansätze enthielten Ascitestumorzellen oder Mäuseleberschnitte in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Medium (RAUEN). Es waren Glucose (5 mg/ml) und INH (100 µg/ml) zugesetzt worden. Ein Teil der INH-Moleküle war ^{14}C-markiert (5-10 x 10^6 c. p. m. /ml). Die Inkubation erfolgte in einem Wasserbad von 38^{o} C mit Schüttelvorrichtung. Die Aufarbeitung der Zellen nach verschiedener Inkubationsdauer (bis zu zwei Stunden) war die gleiche wie unter Methoden zu Teil I beschrieben.

Der trockene Perchlorsäureextrakt wurde in 0, 5 ml aqua dest. gelöst, und ein aliquot davon wurde zur Hochspannungselektrophorese eingesetzt. Ac-INH und INH wurden als Trägersubstanzen mitaufgetragen. Die Lokalisation der Substanzen nach der Trennung erfolgte im UV-Licht und mit Hilfe der beschriebenen Farbreaktionen.

Die dem INH und Ac-INH entsprechenden Flecke wurden ausgeschnitten und ihre Aktivität im Tricarb bestimmt.

Bei den Versuchen mit Mäuseleberschnitten konnten die gefundenen Scintillationsraten auf das Feuchtgewicht der Schnitte bezogen werden.

Bei diesen Versuchen ergab sich weder für Ascitestumorzellen noch für Mäuseleberzellen ein Anstieg der Aktivität über dem Ac-INH-Fleck.

Da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß das gebildete Ac-INH in das Medium übertritt, wurde nun versucht, im Überstand einer Acetonfällung des Mediums aktives Ac-INH nachzuweisen. Aber auch im Medium fand sich kein Anstieg der Ac-INH-Aktivität während der 90 Minuten dauernden Inkubation mit Mäuseleberschnitten.

2.5. Enzymatische Acetylierung des INH mit Taubenleberextrakt

2.5.1. Präparation eines Taubenleberextraktes, der Acetylase-Aktivität zeigt

10 g Acetonpuder von Taubenlebern wurden 10 Minuten mit dem zehnfachen Volumen Wasser bei Zimmertemperatur in einem Mörser extrahiert und der Extrakt anschließend bei 22 000 g und 4^{o} C zehn Minuten zentrifugiert. Das Eiweiß im Überstand wurde dann mit dem gleichen Volumen kalten Acetons gefällt. Nach Abzentrifugieren der Fällung wurde diese getrocknet, in einem Mörser zu feinem Puder zerkleinert und bei 4^{o} C aufbewahrt. Kurz vor Versuchsbeginn löste man die Hälfte des so gewonnenen Acetonpuders in 6 ml Wasser und zentrifugierte den nicht gelösten Anteil ab. Der Überstand wurde dann als Enzymlösung eingesetzt. (TABOR et al. 1953, JENNE et al. 1962).

2.5.2. Verfolgung der Acetylierungsreaktion am Photometer

In alkalischem Milieu weist Ac-INH gegenüber INH einen Absorptionsgipfel bei 303 nm auf, wodurch eine photometrische Aufzeichnung der INH-Acetylierung möglich wird.

Die Absorption von DPH bei 334 nm, der in den beschriebenen Ver-

suchen verwendeten Wellenlänge, und pH 9, 5 liegt bei 0, 002 für eine Konzentration von 150 µg/ml und hat demnach keinen störenden Einfluß auf die Messung.

Die Ansätze enthielten

1, 60 - 2, 02 ml	0, 1 M Pyrophosphatpuffer pH 9, 0
0, 30 ml	50 mM Na_2-EDTA und
	5 mM Natriumthioglykolat
0, 08 - 0, 50 ml	6 mM INH
0, 30 ml	Enzymlösung
0, 30 ml	3 mM Acetyl-Koenzym A .

Das Endvolumen betrug 3, 00 ml. Der Zusatz von EDTA und Thioglykolat dient der Bindung von Schwermetallen, welche die Sulfhydrylgruppe des Enzyms blockieren oder oxydieren und das Enzym damit inaktivieren können (TABOR et al. 1953).

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Ac-CoA. Die Küvetten wurden auf konstanter Temperatur von 25° C gehalten.

Die Extinktionsänderung bei 334 nm wurde vom Schreiber eines Eppendorf-Photometers über 10 Minuten aufgezeichnet. Als Maß der Anfangsgeschwindigkeit der Reakttion wurde die Extinktionsänderung während der ersten fünf Minuten ausgemessen und in ΔE/min umgerechnet. Der Extinktionsanstieg verlief etwa 10 Minuten nahezu linear.

2. 5. 3. Autoradiografischer Nachweis von ^{14}C-Ac-INH

Die Ansätze einer Versuchsreihe enthielten geringe Mengen ^{14}C-INH mit einer spezifischen Aktivität von 9, 85 mC/mM. Hier wurde die Reaktion nach zehn Minuten gestoppt, indem ein gleiches Volumen kalten Acetons zugegeben, das gefällte Eiweiß abzentrifugiert und der Überstand bis zum trockenen Rückstand eingeengt wurde. Von den wieder in kleineren Volumina gelösten Extrakten wurde ein aliquot zur chromatografischen Trennung aufgetragen. Nach Identifikation der Flecke legte man die Chromatografiestreifen zum autoradiografischen Nach-

weis der gebildeten INH-Metaboliten und des unveränderten INH auf Röntgenfilm.

2. 5. 4. Bestimmung eines Einflusses von DPH auf die INH-Acetylierung

Für Ansätze, die DPH enthalten sollten, wurde ein Pyrophosphatpuffer gleicher Molarität und Protonenkonzentration wie oben beschrieben hergestellt und diesem DPH in einer Menge zugesetzt, daß in den Ansätzen eine Endkonzentration von 100 µg/ml und 50 µg/ml erreicht wurde. Die Löslichkeit von DPH wurde durch Erwärmen des Puffers verbessert. Vor Versuchsbeginn war dieser wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt, und das DPH blieb während der Versuchsdauer in Lösung.

3. Ergebnisse und deren Beurteilung

3. 1. Photometrische Aufzeichnung der INH-Acetylierung. Einfluß von DPH.

Im ersten Versuch wurde die Acetylierung des INH photometrisch verfolgt. Abb. 12 (auf Seite 58) zeigt die Versuchsergebnisse im Koordinatensystem nach LINEWEAVER und BURK.

In der Ansatzreihe ohne DPH wurde für die Acetylierung des INH mit Taubenleberextrakt die Michaeliskonstante mit 0, 68 x 10^{-3} M bestimmt. JENNE et al. fanden einen Wert von 0, 51 x 10^{-3} M bei gleicher Konzentration von Acetyl-Koenzym A (0, 3 mM).

Während bei einem DPH-Zusatz mit der Endkonzentration von 50 µg/ml die Acetylierungsrate von INH nicht verändert gefunden wurde, war bei der DPH-Konzentration von 100 µg/ml die Aktivität der Leberacetylase vermindert. Im Koordinatensystem mit 1/S als Abszisse und 1/v als Ordinate ergibt sich eine gegenüber der ersten parallel verschobene Gerade, für die eine niedrigere maximale Geschwindigkeit und eine Michaeliskonstante von 0, 48 x 10^{-3} M abzulesen ist.

Ein Kontrollansatz ohne Acetyl-CoA zeigte keine messbare Acetylierung.

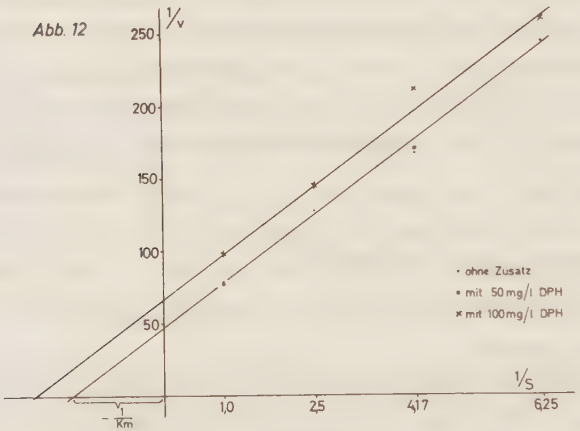


Abb. 12

Ergebnisse einer photometrischen Bestimmung der INH-Acetylierung durch Taubenleberextrakt unter Einfluß von Diphenylhydantoin

Die Ac-CoA-Konzentration betrug durchgehend 0, 3 mM. Die Konzentrationen von INH waren 10×10^{-4} M, 4×10^{-4} M, $2,4 \times 10^{-4}$ M und $1,6 \times 10^{-4}$ M.
(Die Zahlenwerte an der Abszisse sind also mit 1000 zu multiplizieren).

Genaue Erläuterungen zur Methodik finden sich in Abschnitt 2. 5. 2.

3. 2. Autoradiografischer Nachweis von ^{14}C-markierten Substanzen nach Inkubation von ^{14}C-INH mit Ac-CoA und Leberacetylase. Einfluß von DPH.

In einem zweiten Versuch war das INH zum Teil mit ^{14}C markiert. Die Autoradiografie von Chromatogrammen des Überstandes einer Acetonfällung der Inkubationsansätze ergab Aktivitätsflecke mit den Rf-Werten von INH, Ac-INH und Isonikotinsäure (Abb. 13).

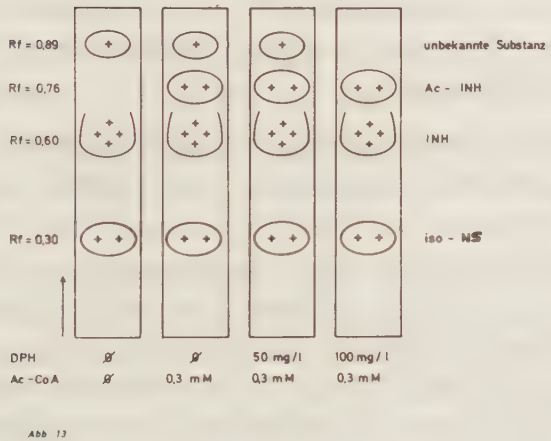


Abb. 13

Papierchromatografische Auftrennung und anschließende Autoradiografie nach Inkubation von ^{14}C-INH mit Ac-CoA und Taubenleberextrakt

Die INH-Aktivitätsflecke erscheinen nicht eng umschrieben, sondern besitzen "Schwänze" in der Laufrichtung des Chromatogrammes. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine erst während der Chromatografie aus INH entstehende Substanz mit größerem Rf-Wert als INH. In Betracht kommt vor allem das Dimere des INH, das nach KRÜGER-

THIEMER in dem hier verwendeten System praktisch denselben Rf-Wert wie das Ac-INH aufweist (vgl. Tabelle auf Seite 53).

Nach den Ergebnissen der photometrischen Untersuchung der INH-Acetylierung unter DPH-Einfluß galt das besondere Interesse den Ac-INH-Flecken. Es war geplant, eine genaue Aktivitätsbestimmung dieser Flecke durch Scintillationsmessung im Tri-Carb vorzunehmen, um einen Einfluß von DPH erkennen zu können. Wegen der schon beschriebenen Überlagerung der Ac-INH-Flecke durch die "Schwänze" des INH war eine solche Messung leider nicht möglich. Ein grober, durch Abschätzen erkennbarer Intensitätsunterschied der Röntgenfilmschwärzung durch ^{14}C-Ac-INH zwischen Ansätzen mit und Ansätzen ohne DPH-Zusatz besteht jedenfalls nicht.

Der Nachweis von geringen Mengen Isonikotinsäure gelang auch GOEDDE, der die Acetylierungsreaktion in einem Puffer von pH 6, 8 ablaufen ließ (GOEDDE et al. 1964). Es ist bekannt, daß INH in stark alkalischem Milieu in Isonikotinsäure und Hydrazin hydrolytisch gespalten wird. Auch ist z. B. Blutserum in der Lage, aus INH Isonikotinsäure freizusetzen (KRÜGER-THIEMER). Ob es sich bei der hier nachgewiesenen Bildung von iso-NS um eine alkalische Hydrolyse oder enzymatische Spaltung handelt, bleibt offen. Übrigens soll die Bildung von iso-NS in Tuberkelbakterien auch das tuberkulostatisch wirksame Prinzip von INH sein (KRÜGER-THIEMER).

Autoradiografisch fand sich noch ein weiterer Fleck mit nur geringer ^{14}C-Aktivität und einem Rf-Wert von 0, 89. Für das verwendete Chromatografiesystem gibt KRÜGER-THIEMER keinen INH-Metaboliten mit solchem Rf-Wert an. Auffallend ist, daß dieser ^{14}C-Fleck bei Ansätzen mit hoher DPH-Konzentration (100 µg/ml) nicht nachzuweisen ist, daß aber in einem Kontrollansatz ohne Acetyl-CoA und DPH dieser Fleck erscheint. Ob es sich hier um einen weiteren enzymatisch gebildeten Metaboliten handelt, dessen Entstehung durch DPH gehemmt

wird, konnte nicht entschieden werden.

3.3. Beurteilung der Ergebnisse

Nach den Gesetzen der Enzymkinetik entspräche die parallel verschobene Gerade in Abb. 12 einer unkompetetiven Hemmung der INH-Acetylierung durch 100 µg/ml DPH, wenn auch schon bei niedrigeren DPH-Konzentrationen ein solcher Einfluß bemerkbar würde. Eine DPH-Konzentration von 50 µg/ml läßt jedoch noch keine Hemmwirkung auf die Leberacetylase erkennen, sodaß also eine Konzentrationsabhängigkeit nicht demonstriert werden kann.

Die therapeutisch verwendeten Dosen von DPH liegen bei 300 - 500 mg/Tag. Die beobachteten Serumkonzentrationen schwanken dabei zwischen 10 µg/ml und 40 µg/ml. Es könnte damit durchaus intrazellulär zu den hier getesteten DPH-Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml kommen.

Um die photometrischen Ergebnisse des ersten Versuches zu überprüfen, wurde ein Kontrollversuch gestartet, der leider aus nicht bekannten Gründen fehlschlug. Die Acetylierungsgeschwindigkeit war kleiner als im ersten Versuch und die Messwerte konnten im Koordinatensystem nach LINEWEAVER und BURK nicht durch eine Gerade verbunden werden. Weitere Kontrollversuche konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da die nötigen Substanzen verbraucht waren, und eine Neubeschaffung mit erheblichen Kosten verbunden gewesen wäre.

4. Zusammenfassung

Extrakt aus Taubenleber besitzt nach Zusatz von Acetyl-Koenzym A die Fähigkeit, INH zu acetylieren. Dies wurde photometrisch und autoradiografisch nachgewiesen. Bei einer Temperatur von 25° C,

einem pH von 9, 0 und einer Koenzymkonzentration von 0, 3 mM konnte die Michaeliskonstante mit 0, 68 x 10^{-4} M bestimmt werden.

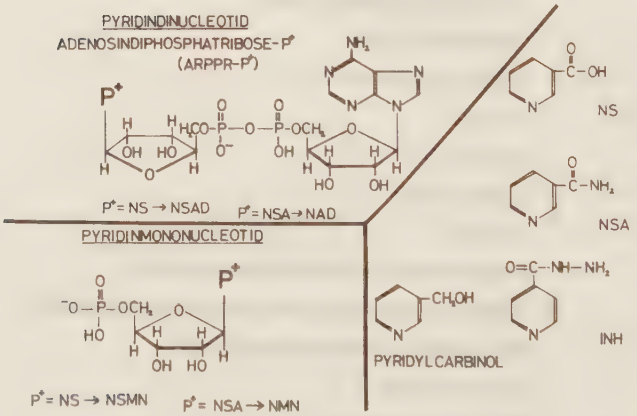
Diphenylhydantoin in einer Konzentration von 100 µg/ml hemmt die INH-Acetylierung im photometrischen Test, während ein Zusatz von 50 µg/ml keinen Effekt zeigt.

Abkürzungen

Ac-CoA	Acetyl-Koenzym A
Ac-INH	Acetyl-INH
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ARPPR	Adenosindiphosphatribose
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Koenzym A
c.p.m.	count per minute
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPH	Diphenylhydantoin
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
HE	Hochspannungselektrophorese
INH	Isonikotinsäurehydrazid
iso-NS	Isonikotinsäure
K_m	Michaelis-Konstante
Koenzym I	= NAD
M	Mol/liter
mM	mMol/liter
mC	mCurie
NAD	Nikotinsäureamidadenindinucleotid
NADP	Nikotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
NMN	Nikotinsäureamidmononucleotid
NS	Nikotinsäure
NSA	Nikotinsäureamid
NSAD	Nikotinsäureadenindinucleotid
NSMN	Nikotinsäuremononucleotid
P	Phosphat
PP	Pyrophosphat
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat

R_{NAD}-Wert	Strecke, die ein Nucleotid in der HE bezogen auf NAD (R_{NAD}= 1) zurückgelegt hat
RNS	Ribonucleinsäure
r. p. m.	revolutions per minute
1/S	Kehrwert der Substratkonzentration
1/v	Kehrwert der Geschwindigkeit einer Enzymreaktion

Strukturformeln einiger Verbindungen



Herkunftsnachweis der weniger gebräuchlichen Substanzen

Ac-CoA	C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim
Ac-INH	wurde uns freundlicherweise von der Hoffmann-La Roche AG, Grenzach zur Verfügung gestellt
ADH	C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim
DPH	EPANUTIN^{R} Parenteral Parke, Davis & Company, München
INH	RIMIFON^{R}, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach
^{14}C-INH	(Carbonyl-^{14}C, spez. Akt. 9, 85 mC/mM) The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghanshire, England
NAD	C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim
Nikotinsäureäthylester	Fa. Schuchardt
NMN	Fa. Serva, Heidelberg
^{14}C-NS	(Carboxyl-^{14}C, spez. Akt. 27, 9 mC/mM) The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England
ß-Pyridylcarbinol	RONICOL^{R} Amp., Hoffmann-La Roche AG, Grenzach
Taubenleber-Acetonpuder	Pentex Inc. USA

Literaturverzeichnis

1. ANDERSON, B.M., C.J. CIOTTI, N.O. KAPLAN
Chemical Properties of 3-substituted Pyridine Analogues of Diphosphopyridine Nucleotide
J. Biol. Chem. 234, 1219 (1959)

2. BEKIERKUNST, A.
Nicotinamide-Adenine Dinucleotide in Tubercle Bacilli Exposed to Isoniazid
Science 152, 525 (1966)

3. BÖNICKE, R.
Eine mikrobiologische Methode zur quantitativen Bestimmung von Isonicotinsäurehydrazid
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 216, 490 (1952)

4. CHAYKIN, S., J. KIRCHNER
Rabbit Liver Nicotinamide Deamidase
Fed. Proc. 24, 480 (1965)

5. COLOWICK, S.P., N.O. KAPLAN, M.M. CIOTTI
The Reaction of Pyridine Nucleotide with Cyanide and its Analytical Use
J. Biol. Chem. 191, 447 (1951)

6. DEFRANCESCHI, A., V. ZAMBONI
Identification of two Metabolities of Isoniazid (Isonicotinoylglycine and 1-Isonicotinoyl-2-Acetylhydrazin) by Paper Chromatography in Rat Urine
Biochem. Biophysica Acta 13, 304 (1954)

7. DEUTSCH, W.
An Improvement of Warburg' s method for cutting tissue slices for respiratory experiments
J. of Physiol. 87, 56 P (1936)

8. DIETRICH, L. S., L. FULLER, I. L. YERO, L. MARTINEZ
Nicotinamide Mononucleotide Pyrophosphorylase Activity in Animal Tissues
J. Biol. Chem. 241, 188 (1966)

9. DIETRICH, L. S., L. MARTINEZ, L. FRANKLIN
Role of the Liver in Systemic Pyridine Nucleotide Metabolism
Die Naturwissenschaften 55, 231 (1968)

10. DIETRICH, L. S., O. MUNIZ, M. POWANDA
NAD Synthesis in Animal Tissues
J. Vitaminol. 14, 123 (1968)

11. DOLD, U., M. MIELSCH, H. HOLZER
DPN-Synthese mit Nicotinsäureamid in zellfreien Extrakten aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
Biochem. Z. 338, 349 (1963)

12. DOLD, U.
Über den metabolischen Arzneimittelumbau und seine Beziehung zu den Arzneimittelnebenwirkungen beim Menschen
Habilitationsarbeit, Fachbereich Klinische Medizin der Universität Tübingen (1970)

13. DOMAGK, G.
Histologische Veränderungen an experimentellen und menschlichen Tumoren nach Darreichung von Zytostatika
Dtsch. Med. Wochenschrift 21, 801 (1956)

14. FUSSGÄNGER, R., U. DOLD, H. HOLZER
Über den Einfluß von Trenimon (2, 3, 5-Trisäthylen-iminobenzochinon-1, 4) auf die Gehalte an freier Nicotinsäure und freiem Nicotinsäureamid in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
Z. Krebsforsch. 69, 275 (1967)

15. GHOLSON, R.K., J. KORI
Enzyme Repression in the Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis in Bacillus subtilis
J. Biol. Chem. 239, PC 2399 (1964)

16. GHOLSON, R.K.
The Pyridine Nucleotide Cycle
Nature 212, 933 (1966)

17. GHOLSON, R.K.
Regulation of NAD Biosynthesis via the Pyridine Nucleotide Cycle
J. Vitaminol. 14, 114 (1968)

18. GOEDDE, H.W., E. SCHOEPF, D. FLEISCHMANN
Studies on Pharmacogenetics
I. The Enzymic Acetylation of Isonicotinic Acid Hydrazide (INH)
Biochem. Pharmacol. 13, 1671 (1964)

19. GOEDDE, H.W., W. SCHLOOT
Untersuchungen zum Polymorphismus der Acetylierung von Isonicotinsäurehydrazid
Med. Welt 51, 2812 (1968)

20. GRUNDMANN, E., H. KRÖGER, H. HOLZER
Vergleichende histologische, cytophotometrische und biochemische Untersuchungen über die Wirkung von Endoxan^{R} auf das Jensen-Sarkom der Ratte
Klin. Wochenschrift 38, 546 (1960)

21. GRUNICKE, H., E. RICHTER, M. HINZ, M. LIERSCH, B. PUSCHENDORF, H. HOLZER
Über den Einfluß von Trenimon (2, 3, 5-Trisäthylen-iminobenzochinon-1, 4) auf den NAD-Stoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
Biochem. Z. 346, 60 (1966)

22. HAGINO, Y., S.J. LAN, C.Y. NG, L.M. HENDERSON
Metabolism of Pyridinium Precursors of Pyridine Nucleotides in Perfused Rat Liver
J. Biol. Chem. 243, 4980 (1968)

23. HEIDELBERGER, C., E.P. ABRAHAM, S. LEPKOVSKY
Tryptophan Metabolism
II. Concerning the Mechanism of the Mammalian Conversion of Tryptophan into Nicotinic Acid
J. Biol. Chem. 179, 151 (1949)

24. HENDERSON, L.M., G.B. RAMASARMA, B.C. JOHNSON
Quinolinic Acid Metabolism
IV. Urinary Excretion by Man and other Mammals as affected by Ingestion of Tryptophan
J. Biol. Chem. 181, 731 (1949)

25. HILZ, H., B. HUBMANN, M. OLDEKOP, M. SCHOLZ, M. v. GOSSLER
Die Wirkung von Röntgenstrahlen und cytostatischen Verbindungen auf DPN-Gehalt und DNS-Synthese in Ascitestumorzellen
Biochem. Z. 336, 62 (1962)

26. HILZ, H., P. HLAVICA, B. BERTRAM
Die entscheidende Bedeutung der DPNase-Aktivierung für den DPN-Abfall in bestrahlten Ascitestumorzellen
Biochem. Z. 338, 283 (1963)

27. HOHORST, H.J.
Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure
Biochem. Z. 328, 509 (1957)

28. HOLZER, H., P. GLOGNER, G. SEDLMAYR
Zum Mechanismus der Glykolysehemmung durch carcinostatisch wirkende Äthyleniminverbindungen
Biochem. Z. 330, 59 (1958)

29. HOLZER, H., G. FRIEDRICH, H. GRISEBACH
Verwertung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid für die Biosynthese von DPN in Ascites-Tumorzellen
Biochim. Biophys. Acta 51, 600 (1961)

30. HUGHES, Hettie B.
On the Metabolic Fate of Isoniazid
J. Pharmacol. Exper. Ther. 109, 444 (1953)

31. IJICHI, H., A. ICHIYAMA, O. HAYAISHI
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide
III. Comparative in vivo Studies on Nicotinic Acid, Nicotinamide, and Quinolinic Acid as Precursors of Nicotinamide Adenine Dinucleotide
J. Biol. Chem. 241, 3701 (1966)

32. IKEDA, M., H. TSUJI, S. NAKAMURA, A. ICHIYAMA, Y. NISHIZUKA, O. HAYAISHI
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide
II. A Role of Picolinic Carboxylase in the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide from Tryptophan in Mammals
J. Biol. Chem. 240, 1395 (1965)

33. JENNE, J.W., P.D. BOYER
Kinetic Characteristics of the Acetylation of Isoniazid and p-Aminosalicylic Acid by a Liver-Enzyme Preparation
Biochim. Biophys. Acta 65, 121 (1962)

34. KAPLAN, N.O. in S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Editors)
Methods in Enzymology, Vol. II, Academic Press, Inc., New York, p. 660 (1957)

35. KAPLAN, N.O., A. GOLDIN, S.R. HUMPHREYS, F.E. STOLZENBACH
Pyridine Precursors of Mouse Liver Diphosphopyridine Necleotide
J. Biol. Chem. 226, 365 (1957)

36. KAPLAN, N.O.
Regulation of Pyridine Nucleotide Coenzymes
J. Vitaminol. 14, 103 (1968)

37. KODICEK, E., K.K. REDDI
Paper Chromatography of Nicotinic Acid Derivates
Nature 168, 475 (1951)

38. KRÜGER-THIEMER, E.
Biochemie des Isoniazids
Jahresbericht Borstel 4, 299 (1956/57)

39. KRÖGER, H., H.W. ROTTHAUWE, B. ULRICH, H. HOLZER
Zum Einfluß von Carcinostatica auf den DPN-Stoffwechsel der Tumoren
I. Einbau von ^{14}C-Ribose und ^{14}C-Nicotinsäureamid in das DPN von Ascites-Zellen
Biochem. Z. 333, 148 (1960)

40. KUN, E., B. LANGER, B. ULRICH, H. HOLZER, H. GRUNICKE
The Role of DPNase in the Mechanism of Action of an Antitumor Alkylating Agent on Ehrlich Ascites Cells
Proc. Nat. Ac. Sc. 52, 1501 (1964)

41. LAMBORG, M., F.E. STOLZENBACH, N.O. KAPLAN
The Nicotinic Acid Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide
J. Biol. Chem. 231, 685 (1958)

42. LANGAN, T.A., Jr., N.O. KAPLAN, L. SHUSTER
Formation of the Nicotinic Acid Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide after Nicotinamide Administration
J. Biol. Chem. 234, 2161 (1959)

43. LISS, E., G. PALME
Die Hemmung des Einbaues von ^{32}P in die DNS durch Endoxan^{R}
Die Naturwissenschaften 50, 336 (1963)

44. MAKINO, K., KINOSHITA, T., ITOH, T.
Biological Acetylation of isoNicotinyl Hydrazide
Nature 173, 36 (1954)

45. MANN, P. J. G., J. H. QUASTEL
Nicotinamide, Cozymase and Tissue Metabolism
Biochem. J. 35, 502 (1941)

46. MEYERHOF, O., P. OHLMEYER, W. MÖHLE
Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung
Biochem. Z. 297, 113 (1938)

47. MIELSCH, M., H. GRIMBERG, U. DOLD, H. HOLZER
Einfluß von Nicotinsäureamid auf DPN-Gehalt, Glykolyse und Vermehrungsfähigkeit von Ascites-Tumorzellen nach Behandlung mit carcinostatischen Äthyleniminverbindungen
Biochim. Biophys. Acta 62, 519 (1962)

48. NISHIZUKA, Y., O. HAYAISHI
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide
I. Enzymic Synthesis of Niacin Ribonucleotides from 3-Hydroxyanthranilic Acid in Mammalian Tissues
J. Biol. Chem. 238, 3369 (1963)

49. PETRACK, B., P. GREENGARD, A. CRASTON, F. SHEPPY
Nicotinamide Deamidase from Mammalian Liver
J. Biol. Chem. 240, 1725 (1965)

50. PREISS, J., P. HANDLER
Enzymatic Synthesis of Nicotinamide Mononucleotide
J. Biol. Chem. 225, 759 (1957)

51. PREISS, J., P. HANDLER
Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide
I. Identification of Intermediates
J. Biol. Chem. 233, 488 (1958)

52. PREISS, J., P. HANDLER
Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide
II. Enzymatic Aspects, ibidem p. 493

53. RACKER, E.
Crystalline Alcohol Dehydrogenase from Bakers Yeast
J. Biol. Chem. 184, 313 (1950)

54. RAUEN, H. M.
Biochemisches Taschenbuch, II. Teil
Springer-Berlin, S. 523 (1964)

55. ROITT, I. M.
The Inhibition of Carbohydrate Metabolism in
Ascites-Tumor Cells by Ethyleneimines
Biochem. J. 63, 300 (1956)

56. ROSEN, F., J. W. HUFF, W. A. PERLZWEIG
The Effect of Tryptophane on the Synthesis of Nicotinic
Acid in the Rat
J. Biol. Chem. 163, 343 (1946)

57. ROSEN, F.
Effect of Isonicotinic Acid Hydracide on Niacin
and Pyridoxine Metabolism in Rats
Soc. Exp. Biol. Med. 88, 243 (1955)

58. ROWEN, J. W., A. KORNBERG
The Phosphorolysis of Nicotinamide Riboside
J. Biol. Chem. 193, 497 (1951)

59. SARMA, D. S. R., S. RAJALAKSHMI, P. S. SARMA
Deamidation of Nicotinamide and NMN
Biochem. Biophys. Res. Com. 6, 389 (1961)

60. SCHMIDT, C. G.
Kanzerostatischer Effekt alkylierender Verbindungen
in Beziehung zur Glykolyse von Tumorzellen in vivo
Z. Krebsforsch. 73, 223 (1970)

61. SHUSTER, L., A. GOLDIN
The Incorporation of C^{14}-Glucose and C^{14}-Ribose
into Mouse Liver Diphosphopyridine Nucleotide
J. Biol. Chem. 230, 873 (1958)

62. STREFFER, C.
in der Discussion zu
DIETRICH, L. S. et al.
NAD Synthesis in Animal Tissues
J. Vitaminol. 14, 123 (1968)

63. SU, S., S. CHAYKIN
Purification and Properties of Nicotinamide Deamidase
Fed. Proc. 25, 280 (1966)

64. TABOR, H., A. H. MEHLER, E. R. STADTMAN
The Enzymatic Acetylation of Amines
J. Biol. Chem. 204, 127 (1953)

65. WANG, Y. L., E. KODICEK
Vitamin Methods
Biochem. J. 37, 530 (1943)

66. WARBURG, O., W. CHRISTIAN
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von
Gärungsfermenten (Pyridin-Nucleotide)
Biochem. Z. 287, 291 (1936)

67. WINDER, F., P. COLLINS
The Effect of Isoniazid on Nicotinamide Nucleotide
Levels in Mycobakterium Bovis, Strain BCG
Am. Rev. Resp. Disease 97, 719 (1968)

68. ZATMAN, L. J., N. O. KAPLAN, S. P. COLOWICK
Inhibition of Spleen Diphosphopyridine Nucleotidase by
Nicotinamide, an Exchange Reaction
J. Biol. Chem. 200, 197 (1953)

69. ZATMAN, L. J., N. O. KAPLAN, S. P. COLOWICK, M. M. CIOTTI
Effect of Isonicotinic Acid Hydrazide on Diphosphopyridine
Nucleotidases
J. Biol. Chem. 209, 453 (1954)

70. ZILVERSMIT, D. B., C. ENTENMAN, M. C. FISHLER
On the Calculation of "Turnover Time" and "Turnover Rate"
from Experiments involving the Use of Labeling Agents
J. gen. Physiol. 26, 325 (1943)

Lebenslauf

Als Sohn des Arztes Dr. med. Erich Schomerus und seiner Ehefrau Margarete, geb. Seiffert wurde ich, Peter S c h o m e r u s, am 2. April 1943 in Freiburg i. Br. geboren. Ich besuchte die altsprachlichen Zweige des Bertold-Gymnasiums in Freiburg und des Katharineums zu Lübeck, wo ich am 6. Februar 1963 die Reifeprüfung bestand.

Nach einjährigem Wehrdienst begann ich im SS 1964 das Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Am 27. September 1966 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung, am 11. Februar 1970 die ärztliche Prüfung ab.

Die während des klinischen Studiums aufgenommenen Versuche zur Dissertationsarbeit schloß ich nach dem Examen ab und begann am 1. Oktober 1970 die Medizinalassistentenausbildung an der Inneren Klinik am Klinikum Essen (Direktor : Prof. Dr. C. G. Schmidt). Anschliessend lernte ich an der Neurologischen Klinik am Klinikum Essen (Direktor : Prof. Dr. H. J. Lehmann). Nach der chirurgischen Pflichtzeit am Städt. Krankenhaus Schöningen (Braunschw.) (Chefarzt : Dr. med. habil. H. Adler) erhielt ich am 28. Oktober 1971 meine Approbation als Arzt.

Am 1. November 1971 wurde ich zur Ableistung meiner restlichen Wehrpflichtzeit einberufen und war sechs Monate als Truppenarzt tätig. Meine Facharztausbildung begann ich am 15. August 1972 im Silikose-Fachkrankenhaus Grafschaft/Hochsauerland und bin seit dem 1. Juli 1973 Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Zentralkrankenhauses der LVA Oberbayern in Gauting bei München.